

**Desenvolvimento de um inóculo seguro,  
eficiente e padronizado para a produção de  
tempeh em pequena escala a partir de  
diferentes leguminosas**

**Ivone Lopes Cruz**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Engenharia Alimentar**

Orientador - Doutora Catarina Paula Guerra Geoffroy Prista, Professora Auxiliar  
do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

**Júri:**

Presidente - Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Auxiliar com  
Agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Vogais - Doutor Manuel José de Carvalho Pimenta Malfeito Ferreira, Professor Auxiliar  
com Agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa;  
- Doutora Catarina Paula Guerra Geoffroy Prista, Professora Auxiliar do Instituto  
Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

“Se não puder se destacar pelo  
talento, vença pelo esforço”

Dave Weinbaum.

## Agradecimentos

Ao concluir esta etapa importante da minha vida, a única certeza que tenho é que não se conquista o sucesso sozinho.

Dedico, então, este espaço a todos os que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Pelo precioso contributo que levaram ao sucesso deste trabalho

À Doutora Catarina Prista por ter aceitado orientar este trabalho, pelo apoio, entendimento e disponibilidade.

A todos os colegas e investigadores do Laboratório de Bioenergética Microbiana.

Às minhas colegas de trabalho pelo carinho e compreensão. Assim como às minhas colegas da faculdade.

Ao Senhor José Bráz da Fundação António Bráz pela bolsa que me foi facultada, obrigado.

Quero deixar um especial e enorme agradecimento à minha mãe, Joana, irmãos, irmãs e sobrinhos pela força e apoio demonstrado em todos os momentos, e a quem devo tudo o que aprendi.

A todos Muito Obrigado

## Resumo

Atendendo ao valor nutritivo e potencial enquanto Alimentos Funcionais, e à sua diversidade e originalidade, os alimentos fermentados asiáticos, à base de leguminosas, são muito desejados. Contudo, a sua produção ocorre frequentemente em condições não-controladas, incompatíveis com as exigências de segurança e qualidade do consumidor ocidental.

O Tempeh é um alimento indonésio, à base de feijão de soja fermentado com *Rhizopus oligosporus*.

O objectivo deste trabalho foi desenvolver inóculos seguros e eficientes de *Rhizopus oligosporus* e processos fermentativos controlados, para produzir de tempeh de forma segura e padronizada.

Assim, otimizou-se o processo de crescimento de *Rhizopus oligosporus* e a preparação e a concentração de inóculo a utilizar. Para além disso, com base nos passos tradicionais de manufactura de tempeh, otimizaram-se os passos de demolha do grão, e os parâmetros de fermentação.

Através dos passos de optimização, atingiu-se um procedimento que permitiu produzir inóculos seguros e viáveis e um procedimento padrão, utilizado na fermentação controlada de feijão de soja, que resultou num tempeh com as propriedades organolépticas desejadas. O embalamento a vácuo e congelação permitiram manter as propriedades organolépticas do produto. As condições optimizadas permitiram ainda a produção de outras variedades de tempeh.

Palavras-chave: Tempeh, fermentação, leguminosas, Inóculo seguro, *Rhizopus oligosporus*, viabilidade dos esporos.

## Abstract

Fermented foods from Eastern countries, based on crop fermentations are among the most desired by consumers for their nutrition value and potential as Functional foods and for their diversity and originality. Yet, these products are usually produced by spontaneous and poorly characterized fermentations under non-controlled conditions, which are not compatible with the high quality standards demanded by Western consumers.

Tempeh is a popular Indonesian fermented food, originally based on soybean fermented by *Rhizopus oligosporus*.

The objective of this work was to produce safer and effective *Rhizopus oligosporus* inocula and design standard procedures for safe and consistent tempeh production and conservation. Additionally new tempeh-like fermented products were also produced.

*Rhizopus oligosporus* growth and inoculum preparation and inoculum concentration added to the crop, were optimized to obtain standard tempeh with the desired organoleptic properties. Adjustments on the production steps described for the traditional tempeh manufacture (soaking and fermentation parameters) were also made.

Using the optimized procedures, a standard method for inocula and tempeh production was developed. Tempeh maintained its organoleptic properties when stored under vacuum in thermo sealed polypropylene bags and frozen until consumption. The production of several varieties of tempeh using different crops was accomplished under these conditions.

Keywords: Tempeh, Fermentation, Legumes, Inoculum, *Rhizopus oligosporus*, Spore viability

## Extended abstract

The growing consumer interest in healthier and/or special consumption behaviours together with curiosity for new diets, and the availability of new food and beverage brought by globalization, is transforming the food industry as we know it, and redefining the relationship between food, nutrition, and health. A focus of the modern food industry is now to develop Functional Foods, healthier and more flavourful. Among these, fermentations are time-honored methods of food processing.

Combining novelty and health, sales of some popular fermented ethnic foods such as Asiatic foods experimented a noticeably rise in the last years in occidental countries. They include, but are not limited to, well know fermented foods and seasoning obtained from the fermentation of amylaceous and proteinaceous crops like miso and soya sauce but also traditional foods like amazaké, natto and tempe, saké and shochu among other less recognized specialities. Many of them can be considered as Functional foods.

Among the Asian fermented foods, tempeh is one of the most popular. Tempeh is a fermented food, originally based on soybean, produced traditionally in Indonesia by fermentation with a fungus, usually *Rhizopus oligosporus*.

The fermentation process of tempeh, results in a significant increase in their soluble fraction and digestibility and a decrease of toxic compounds, and thus increases their nutrition value and potential as Functional foods. The quality of the proteins increases, the lipid content is reduced and often the content of water-soluble vitamins is increased, while the anti-nutritional factors decline during fermentation. Also, the digestibility of starch increases, phytic acid is degraded, the trypsin inhibitor is inactivated, and the amount of several oligosacharides (e.g. stachyose and raffinose), which usually cause flatulence, is significantly reduced.

Nevertheless, the production of these fermented products face some obstacles coming from the fact most of the traditional fermented foods are resultant from spontaneous fermentations carried out under household non-controlled conditions and poorly characterized regarding the effect of fermentation on structural and rheological properties. This is not compatible with the high quality standards demanded by Western consumers.

In recent years, the Microbial Bioenergetic Lab has been involved on the Fermented Food production research field. As a result of this activity, a collection of bacteria, yeast and mold pure strains related to fermented foods is kept and proliferated in the laboratory, and is made available for the community. Some of the strains were specifically isolated and purified

from Asian fermented foods including tempeh. These strains can be combined and used as starters for the production of fermented products.

The use of starter cultures will certainly optimize the process of fermentation, eliminating chances of contamination of product with pathogens and spoilage organisms, ultimately improving product quality.

The main objectives of this work were to produce safe and effective inocula of *Rhizopus oligosporus* to be used in the production of tempeh on a small scale-basis and to optimize the production process of tempeh in order to obtain a homogeneous and safe product, produced by controlled and reproducible processes (from soaking step to package and preservation). Additionally, new forms of tempeh produced from several different crops (black turtle, red and white beans, cowpeas and chickpeas, lentil, Mungo beans and barley) were also developed and consumer acceptance was evaluated.

The optimization of inoculum of *Rhizopus oligosporus* was performed by testing two different growth media (MEA and PDA) and two different spore concentrations, inoculated in dried sterile flour. The conservation method, in order to maintain *Rhizopus oligosporus* inocula, was also optimized. The viability of the inoculum and its ability to ferment crops and produce good tempeh was tested for 4 months.

The optimization of Tempeh production was performed, by making adjustments to several of the production steps: soaking, inoculum concentration and fermentation parameters.

Concerning the soaking step, soaking water pH was measured up to 24 hours. The development of lactic acid bacteria and occurrence of lactic acid fermentation during this process was accessed by measuring pH during soaking. The effect of the addition of lactic acid to the soaking water was also evaluated.

As far as the fermentation process concerns, two different amounts of filamentous fungi spores in dried flour and two incubation time and temperature, as well of perforated bags were tested. The optimal incubation time and temperature were determined under static conditions at 28 and 37°C, for 24 and 48 hours by with daily observation of fungi growth and fermented product texture.

The best conservation method to preserve tempeh organoleptic characteristics was also assessed.

The final process for production of *R. oligosporus* inocula for tempeh fermentation was obtained by inoculating  $10^6$  spores/g of steam sterilized flour, dried and grinded. Viable inocula were obtained for up to 4 months by preservation under freezing conditions. For

tempeh production, 5g of inoculated flour was used to inoculate 100g of crop, package in perforated plastic bags (holes spaced by 0.5cm) and incubated at 28°C for 48 hours. Tempeh was stored under vacuum in thermo sealed polypropylene bags and frozen until consumption without losing its flavour properties. The production of several varieties of tempeh using different crops was accomplished under these conditions.

Ultimately, this project will be a step in the promotion of safe production of new fermented foods, helping to disseminate new healthier consumer habits and to increase the demand for these products.

Keywords: Tempeh, Fermentation, Crops, *Rhizopus oligosporus*, safe inocula.



# Índice Geral

AGRADECIMENTOS .....	II
RESUMO .....	III
ABSTRACT .....	IV
EXTENDED ABSTRACT .....	V
ÍNDICE GERAL .....	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS .....	X
ÍNDICE DE TABELAS .....	XI
<b>1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS .....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO TEÓRICA .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Enquadramento Histórico .....</b>	<b>3</b>
<b>2.2. Métodos de conservação de alimentos .....</b>	<b>3</b>
<b>2.3. Alimentos fermentados .....</b>	<b>5</b>
2.3.1. Importância dos alimentos fermentados na Europa, Ásia e América .....	6
2.3.2. Tipos de Alimentos fermentados .....	7
2.3.3. Propriedades dos alimentos fermentados .....	8
2.3.4. Alimentos fermentados orientais .....	11
<b>2.4. O Tempeh .....</b>	<b>12</b>
2.4.1. Processo de produção .....	13
.....	17
2.4.2. Preparação do inóculo .....	18
2.4.3. Microbiota do tempeh .....	20
2.4.4. Nutrição e Segurança alimentar .....	21
2.4.5. Formas de embalagem e conservação .....	22
<b>2.5. <i>Rhizopus oligosporus</i> .....</b>	<b>23</b>
2.5.1. Características gerais dos fungos .....	23
2.5.2. Características específicas de <i>Rhizopus</i> .....	24
2.5.3. Produção de Micotoxinas e questões de segurança alimentar .....	26
<b>2.6. Bactérias Lácticas .....</b>	<b>27</b>
2.6.1. Fermentação por bactérias lácticas .....	27
2.6.2. Bioquímica .....	28
<b>2.7. Análise sensorial .....</b>	<b>29</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>31</b>
<b>3.1. Estirpe, meios de cultura e condições de manutenção .....</b>	<b>31</b>
<b>3.2. Métodos de Contagem de esporos e microrganismos .....</b>	<b>31</b>
3.2.1. Contagens de esporos .....	31
3.2.2. Contagem de microrganismos mesófilos totais e contagem de bactérias lácticas .....	32
<b>3.3. Preparação do inóculo para produção de tempeh .....</b>	<b>32</b>
3.3.1. Preparação da “cultura-mãe” .....	32

3.3.2. Preparação e manutenção do inóculo .....	32
<b>3.4. Preparação da Matéria-prima para elaboração do tempeh .....</b>	<b>33</b>
3.4.1. Substratos utilizados .....	34
3.4.2. Preparação da matéria-prima .....	34
<b>3.5. Preparação e conservação de Tempeh.....</b>	<b>36</b>
3.5.1. Inoculação e incubação .....	36
3.5.2. Conservação .....	36
<b>3.6. Avaliação da viabilidade do inóculo ao longo do processo de conservação .....</b>	<b>37</b>
<b>3.7. Análise sensorial.....</b>	<b>37</b>
3.7.1. Análise descritiva .....	37
3.7.2. Análise hedónica .....	38
<b>3.8. Análise estatística .....</b>	<b>39</b>
3.8.1 Análise em Componentes Principais .....	39
3.8.2Análise de Clusters .....	40
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>41</b>
<b>4.1. Desenvolvimento de metodologias para produção de inóculos seguros e padronizados para a produção de tempeh.....</b>	<b>42</b>
4.1.1. Estabelecimento das condições ótimas para esporulação de <i>Rhizopus oligosporus</i> .....	42
4.1.2. Otimização do método de inoculação de <i>Rhizopus oligosporus</i> .....	43
4.1.3. Otimização do processo de conservação do inóculo de <i>Rhizopus oligosporus</i> .....	44
<b>4.2. Desenvolvimento do processo de produção de tempeh de forma padronizada e consistente.....</b>	<b>47</b>
4.2.1. Estudo do efeito das condições de demolha no processo de produção de tempeh .....	47
4.2.2. Estudo da influência das condições de fermentação na produção de tempeh .....	52
4.2.3. Otimização das condições de embalagem e conservação do Tempeh .....	55
4.2.4. Resumo das condições otimizadas para a produção de tempeh .....	57
<b>4.3. Estudo da influência do tempo de armazenamento do inóculo na produção de tempeh</b>	<b>57</b>
<b>4.4. Análise estatística .....</b>	<b>58</b>
4.4.1. Análise em Componentes Principais .....	58
4.4.2. Análise de Clusters .....	60
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPETIVAS FUTURAS .....</b>	<b>67</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>71</b>
<b>CIBERGRAFIA.....</b>	<b>77</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>79</b>
A1 - Meio de cultura .....	79
A2 - Contagem de esporos.....	80
A3 - Registos de pH .....	81
A4 - Análise estatística .....	82
Metodologias .....	82

## Índice de Figuras

FIGURA 1 - DIFERENTES LEGUMINOSAS .....	12
FIGURA 2 - TEMPEH CRU .....	12
FIGURA 3 - TEMPEH FRITO.....	13
FIGURA 4 - DIAGRAMA DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE TEMPEH EM PEQUENA ESCALA.....	14
FIGURA 5: TEMPEH EMBALADO EM CASCA DE BANANEIRA.....	17
FIGURA 6: TEMPEH EMBALADO EM SACOS DE PLÁSTICO .....	17
FIGURA 7 - ETAPAS DO PROCESSO DE OBTENÇÃO DO INÓCULO .....	18
FIGURA 8 - EMBALAMENTO DE TEMPEH EM FOLHAS DE BANANEIRA .....	22
FIGURA 9 - TEMPEH EMBALADO EM SACOS DE PLÁSTICO.....	22
FIGURA 10 - IMAGEM DE RHIZOPUS OLIGOSPORUS NO MICROSCÓPIO .....	23
FIGURA 11 - ESCALA DE CLASSIFICAÇÃO HEDONÍSTICA.....	30
FIGURA 12 - FICHA DE ANÁLISE SENSORIAL DESCRITIVA .....	38
FIGURA 13 - FICHA DE ANÁLISE SENSORIAL HEDÔNICA PARA TEMPEH.....	39
FIGURA 14 - CRESCIMENTO DE FUNGO EM MEIO PDA E MEIO MEA AO FIM DE 3 DIAS DE INCUBAÇÃO. .	42
FIGURA 15 - ASPETO DOS FUNGOS APÓS 5 DIAS DE INCUBAÇÃO .....	43
FIGURA 16 - ASPETO DO INÓCULO CONSTITUÍDO POR FARINHA + ESPOROS DE <i>R. OLIGOSPORUS</i> . .....	44
FIGURA 17 – INÓCULO PARA PRODUÇÃO DE TEMPEH (SEMANA 0) .....	45
FIGURA 18 – INÓCULO PARA PRODUÇÃO DE TEMPEH CONSERVADO À TEMPERATURA AMBIENTE (SEMANA 3).....	45
FIGURA 19 - FARINHA INOCULADA EMBALADA EM SACO .....	46
FIGURA 20 – VARIAÇÃO DO PH DA ÁGUA DE DEMOLHA DE GRÃOS DE SOJA AO LONGO DO TEMPO COM E SEM ADIÇÃO DE 0,5% (P/V) DE ÁCIDO LÁCTICO .....	48
FIGURA 21 – VARIAÇÃO DO PH DA ÁGUA DE DEMOLHA DE LENTILHAS (A), FEIJÃO MUNGO (B) E CEVADA (C) AO LONGO DO TEMPO COM E SEM ADIÇÃO DE 0,5% (P/V) DE ÁCIDO LÁCTICO.....	49
FIGURA 22 – DIFERENÇAS DOS SUBSTRATOS (SEM ÁCIDO E COM ÁCIDO).....	49
FIGURA 23 – VARIAÇÃO DO PH DA ÁGUA DE DEMOLHA DE VÁRIAS MATÉRIAS-PRIMAS LEGUMINOSAS SEM ADIÇÃO DE ÁCIDO LÁCTICO. ....	50
FIGURA 24 - DEMOLHA DE LENTILHAS COM ÁCIDO LÁCTICO EM MEIO MRS.....	51
FIGURA 25 - DEMOLHA DE LENTILHAS COM ÁCIDO LÁCTICO EM MEIO YPD .....	51
FIGURA 26 - OBSERVAÇÃO MICROSCÓPICA DE BACTÉRIAS LÁCTICAS .....	52
FIGURA 27 - RESULTADO FINAL DA FERMENTAÇÃO – TEMPEH – PARA VÁRIOS TIPOS DE LEGUMINOSAS .....	54
FIGURA 28 - EXEMPLOS DE TEMPEH REJEITADO .....	54
FIGURA 29 - EXEMPLOS DE TEMPEH COM 48 HORAS DE INCUBAÇÃO A 28°C .....	55
FIGURA 30 - TEMPEH ARMAZENADO NO FRIGORÍFICO AO FIM DE 1 SEMANA .....	55
FIGURA 31 - TEMPEH EMBALADO A VÁCUO E ARMAZENADO NO FRIGORÍFICO .....	56
FIGURA 32 - ASPETO TEMPEH CONGELADO.....	56
FIGURA 33 - BIPLLOT DAS AMOSTRAS E DAS VARIÁVEIS.....	59

FIGURA 34 - DENDROGRAMA E HEATMAP DOS CONSUMIDORES EM RELAÇÃO AOS ATRIBUTOS DO TEMPEH DE SOJA.....	61
FIGURA 35 - DENDROGRAMA E HEATMAP DOS CONSUMIDORES EM RELAÇÃO AOS ATRIBUTOS DO TEMPEH DE TREMOÇO.....	62
FIGURA 36 - DENDROGRAMA E HEATMAP DOS CONSUMIDORES EM RELAÇÃO AOS ATRIBUTOS DO TEMPEH DE GRÃO.....	63
FIGURA 37 - DENDROGRAMA E HEATMAP DOS CONSUMIDORES EM RELAÇÃO AOS ATRIBUTOS DO TEMPEH DE FEIJÃO PRETO. ....	64
FIGURA 38 - DENDROGRAMA E HEATMAP DOS CONSUMIDORES EM RELAÇÃO AOS ATRIBUTOS DO TEMPEH DE FEIJÃO VERMELHO. ....	65
FIGURA 39 - HEMOCITÓMETRO .....	80
FIGURA 40 - LINHA VERMELHA MOSTRA A DISTRIBUIÇÃO PRINCIPAL DOS DADOS E A LINHA AZUL A DISTRIBUIÇÃO SECUNDÁRIA.....	82

## Índice de tabelas

TABELA 1: ALGUNS MÉTODOS TRADICIONAIS DE PREPARAÇÃO COMERCIAL DE TEMPEH A PARTIR DE FEIJÃO SOJA.....	14
TABELA 2 - COMPARAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO COLÓNIAS DE BACTÉRIAS.....	51
TABELA 3 - IMPORTÂNCIA DOS COMPONENTES.....	58
TABELA 4 - ANÁLISE DE VARIÂNCIAS DAS VARIÁVEIS .....	58
TABELA 5 - ANÁLISE DA CORRELAÇÃO ENTRE AS COMPONENTES PRINCIPAIS E AS VARIÁVEIS .....	59
TABELA 6 - EVOLUÇÃO DO PH NA ÁGUA DE DEMOLHA.....	81
TABELA 7 - REGISTO DA OBSERVAÇÃO DO PH .....	81

## 1. Introdução e Objetivos

Segundo a FAO (Organização das Nações Unidas para Alimentação e a Agricultura), quase 1 bilhão de pessoas, a maioria nos países em desenvolvimento, sofrem de desnutrição crônica, comendo menos do que o necessário para atingir os níveis mínimos de energia. Outros tantos milhões sofrem de má nutrição aguda durante os períodos de falta sazonal ou transitória de alimentos. A mortalidade, principalmente a infantil, por subnutrição de energia proteica, é elevada: cerca de 13 milhões morrem todos os anos antes de completar 5 anos de idade, como resultado direto da fome ou de nutrição insuficiente. A simples produção de alimentos não é tudo. Se não houver meios adequados para conservá-los e distribuí-los, o problema mundial não irá tão-somente persistir mas será severamente agravado.

A produção de alimentos, sua conservação e distribuição são pois, de longa data, problemas estratégicos a serem resolvidos com a máxima urgência, pois como se sabe, o crescimento populacional é mais acelerado do que o da disponibilidade de alimentos.

Desde sempre que a produção de alimentos e bebidas fermentadas tem sido usada como forma de conservação de matérias-primas perecíveis, uma forma efetiva de aumentar o tempo de prateleira de alimentos.

Atualmente assiste-se a uma globalização dos gostos dos consumidores. A par existe também uma crescente solicitação por parte do consumidor, de produtos saudáveis e diversificados. O crescente interesse dos consumidores por alimentos mais saudáveis e por hábitos de consumo específicos aliado à curiosidade por novos tipos de alimentação e ao aumento da disponibilidade de novos alimentos e bebidas tem vindo a redefinir as relações entre alimentação, nutrição e saúde. Neste sentido, nos últimos anos a indústria alimentar tem vindo a prestar crescente atenção ao desenvolvimento de alimentos funcionais, mais saudáveis e saborosos, entre os quais se encontram muitos dos alimentos fermentados (Granato *et al*, 2010; Nehir e Simsek, 2012), nomeadamente produtos fermentados tradicionais asiáticos.

Assim, as fermentações, como forma de preservar os alimentos e de acrescentar variabilidade, têm vindo a ganhar uma enorme visibilidade, não só pela sua capacidade de longevidade mas também pela elevada capacidade nutricional destes alimentos e pela introdução de maior diversidade em termos de tipos de alimentos que permitem.

No entanto, tradicionalmente, os alimentos são obtidos por meio de fermentações naturais, levadas a cabo em condições não-controladas a produção em larga escala e de

forma mais consistente, exige o uso de técnicas pouco caracterizadas (Handoyo e Morita, 2006) o que não é compatível com os elevados padrões de exigência de qualidade e segurança alimentar dos consumidores ocidentais. Assim, a tendência é para que cada vez mais se usem sistemas de partida definidos e culturas de arranque selecionadas para garantir a consistência e qualidade no produto final (Steinkraus, 1997).

O fabrico de tempeh é uma das formas de melhorar a qualidade nutricional do feijão soja e de outras leguminosas, originando um alimento seguro, do ponto de vista microbiológico e uma alternativa ao consumo de carne, fornecendo nutrientes essenciais como a proteína ou a vitamina B.

O tempeh pode ser visto como um produto com elevado potencial, na medida em que reúne num só tipo de alimento as características essenciais para ser aceite não só pelos consumidores mais curiosos como por parte daqueles que pretendem uma alimentação saudável e variada. No entanto, apesar da crescente popularidade, não existem no mercado português inóculos adequados para a sua produção artesanal de forma segura e fiável.

O presente trabalho pretende dar um contributo para que de futuro venha a ser possível produzir tempeh artesanal, através de inóculos seguros e fiáveis. Para tal, pretende-se 1) Desenvolver um inóculo seguro, eficiente e padronizado para a preparação de tempeh em pequena escala e 2) desenvolver receitas para produção de tempeh a partir de diferentes leguminosas, aumentando a diversidade de produtos fermentados à base de leguminosas que podem ser produzidos por potenciais interessados. Mais especificamente pretendeu-se: 1) Otimizar a produção de inóculos através da manipulação de diferentes fatores como sejam a temperatura de incubação e meio de cultura para produção de esporos, 2) otimizar as condições de produção de tempeh tais como temperaturas de incubação e quantidade inóculo, 3) estudar as condições de embalamento/armazenamento e determinar o tempo de prateleira do tempeh, 4) estudar condições de conservação da viabilidade e capacidade de crescimento (“tempo de prateleira”) do inóculo e 5) analisar a aceitação do produto fermentado por parte do público.

## 2. Revisão teórica

### 2.1. Enquadramento Histórico

A fermentação de alimentos derivados de laticínios tem sido muito estudada nos últimos séculos na Europa. Em virtude dos estudos efetuados, o seu processamento foi padronizado e industrializado para garantir uma produção eficiente de produtos alimentares seguros e nutritivos (Lee, 1997).

O processamento moderno de alimentos depende de uma variedade de tecnologias de conservação para garantir que os alimentos são mantidos a um nível de qualidade aceitável desde o momento de fabrico até ao momento de consumo. Uma das tecnologias mais antigas de conservação de alimentos é a fermentação, um processo dependente da atividade biológica de microrganismos para a produção de uma série de metabolitos e alteração das propriedades organoléticas das matérias-primas e que, para além disso, podem induzir a diminuição do crescimento e da sobrevivência da microbiota indesejável nos alimentos [(Ross *et al*, 2002; Kao and Frazier; 1966; Price and Lee, 1970; Klaenhammer, 1988)].

Embora as fermentações tenham sido explorados como método para a conservação de alimentos e bebidas durante milhares de anos, foi apenas num passado mais recente, sobretudo com os trabalhos de Louis Pasteur, de que os microrganismos foram reconhecidos como sendo responsáveis pelo processo de fermentação (Ross *et al*, 2002; Bourdichon, 2012).

Com a revolução industrial, e consequente concentração das populações nas grandes cidades e o encaminhamento da produção de alimentos de larga escala para as comunidades locais, deu-se o desenvolvimento do processo de fermentação em larga escala para produção comercial de alimentos fermentados e bebidas alcoólicas como forma de conservar os alimentos (Ross *et al*, 2002).

### 2.2. Métodos de conservação de alimentos

Os processos de conservação têm por objetivo evitar as alterações dos alimentos, sejam elas de origem microbiana, enzimática, física ou química, mantendo o alimento o mais estável possível, isto é, preservando o alimento ao longo do tempo, evitando a sua deterioração e aumentando o seu tempo de prateleira. Existem diferentes meios de conservação dos alimentos, agrupando-se essencialmente em dois tipos: aquele que

permitem prevenir ou retardar o desenvolvimento dos microrganismos indesejáveis e os previnem ou retardam reações de autólise ou oxidação (Lacasse, 1999).

Dentro dos vários métodos comuns de conservação os mais utilizados são:

- ✚ Conservação pelo calor como a pasteurização e a esterilização – que procura eliminar total ou parcialmente a microbiota de alteração e patogénica, bem como destruir enzimas que possam alterar o alimento;
- ✚ Conservação pelo frio como a refrigeração e o congelamento – que procura reduzir para níveis mínimos o crescimento de microrganismos e a atividade enzimática;
- ✚ Conservação pelo controlo da humidade e pela adição de um soluto como a desidratação, a salmoura ou a adição de elevadas concentrações de açúcar – que procura reduzir o crescimento microbiano e a atividade enzimática através da redução dos valores da atividade da água para níveis que não permitem a proliferação microbiana e/ou a atividade enzimática;
- ✚ Conservação por fumagem como a produção de enchidos – que procura reduzir o número de microrganismos de alteração alimentar e patogénicos pela incorporação de compostos tóxicos resultantes da queima da madeira;
- ✚ Conservação pela adição de conservantes – que procura reduzir e/ou inibir o crescimento microbiano e atividade enzimática quer pela adição de compostos (geralmente ácidos fracos) que levam a um abaixamento dos valores de pH do alimento e frequentemente têm ação antimicrobiana;
- ✚ Conservação pelo uso da irradiação – que procura eliminar a microbiota de alteração e patogénica pela aplicação de radiação não-ionizante, (Lacasse, 1999).

Para além destes, a fermentação poderá ser também encarada como um processo de conservação.

A conservação de alimentos e bebidas através da fermentação tem sido uma forma efetiva de prolongar o tempo de conservação dos alimentos. Para além disso, a conservação dos alimentos por fermentação não só garante o aumento do tempo de prateleira e segurança microbiológica do alimento, como também torna o alimento mais digerível (Caplice e Fitzgerald, 1999).

O processo de conservação por fermentação baseia-se na competição entre espécies microbianas, em que uma ou mais espécies inibem as demais, por competirem pelos nutrientes disponíveis e pela produção de metabolitos antimicrobianos a partir dos substratos presentes no próprio alimento. Os metabolitos, geralmente ácidos orgânicos, álcoois e CO<sub>2</sub>, limitam o crescimento de agentes patogénicos e evitam a deterioração pela microbiota de alteração (Ross *et al*, 2002).



Na maior parte dos casos, toda a metodologia e conhecimento relacionado com a fermentação para conservação de alimentos era passado de geração em geração em comunidades locais, mosteiros entre outros, sendo que estes grupos fabricavam em pequena escala e distribuíam na sua localidade (Caplice e Fitzgerald, 1999).

De acordo com Ross *et al* (2002), como este processo de conservação, fermentação, altera as propriedades organoléticas dos alimentos, tornando-as agradáveis ao consumidor, levou a que este processo também passasse a ser utilizado para modificar estas propriedades com vista à obtenção de produtos com novas características de consumo.

### 2.3. Alimentos fermentados

A fermentação de alimentos é uma das formas de processamento e método de conservação de alimentos mais antiga. Este método acompanha o Homem desde os tempos remotos e está presente em todos os povos e culturas (Scott e Sullivan, 2008). Existem registos ancestrais do uso de fermentados pelos sumérios, babilónicos e egípcios, bem como inscrições datadas de mais de 1000 anos AC do uso da soja fermentada pelos chineses. Tradicionalmente, os alimentos eram conservados através de fermentações que ocorriam de forma natural, no entanto a modernização e o processamento a larga escala levou ao uso de estirpes definidas, inoculadas de forma controlada (starters) de modo a garantir a consistência e qualidade do produto final (Ross *et al*, 2002).

Steinkraus (1997), definiu alimentos fermentados como sendo, substratos alimentares que são cobertos por microrganismos comestíveis, cujas enzimas, particularmente amílases, protéases, e lípases, hidrolisam os polissacáridos, proteínas e lípidos em produtos não tóxicos com flavour, aroma e texturas agradáveis e atrativas para consumo humano.

Em meados do século XIX, dois eventos aconteceram, e tiveram grande impacto na maneira como a fermentação de alimentos era efetuada e como o processo era compreendido. O primeiro evento foi a revolução industrial que resultou na deslocação da população para a cidade, significando que os métodos de distribuição local deixaram de fazer sentido. E o segundo, foi o desenvolvimento da microbiologia como ciência, em que a base biológica da fermentação era compreendida pela primeira vez, ou seja, o papel das bactérias, fungos, na geração de alimentos fermentados eram finalmente entendidos e com isso as fermentações eram controladas e mais eficientes (Caplice e Fitzgerald, 1999).

A popularidade dos alimentos fermentados é um fato desde os tempos ancestrais até aos dias de hoje e resulta das propriedades que apresentam e mantêm. Estes alimentos são a base de bebidas alcoólicas, vinagre e alimentos como queijo, iogurtes, e enchidos, bem como de muitos alimentos orientais como o miso, o tempeh, o molho de soja entre outros. A produção de alimentos por fermentação, para além de ser uma forma de dispor e conservar uma vasta quantidade de alimentos nutricionalmente ricos e seguros, proporciona alimentos com grande diversidade de flavours, aromas e texturas os quais enriquecem a dieta humana [(Steinkraus, 1997; Steinkraus, 1994)].

Assim, se o original e principal objetivo de fermentar os alimentos era chegar a conservação efetiva, com o desenvolvimento de muitas alternativas efetivas às tecnologias de fermentação, esta deixou de ser a grande exigência, e a maioria destes alimentos são produzidos devido ao seu flavour único, aroma e textura, atributos esses que são mais apreciados pelo consumidor (Caprice e Fitzgerald 1999).

### **2.3.1. Importância dos alimentos fermentados na Europa, Ásia e América**

Quando se estudam os hábitos alimentares de todas as culturas espalhadas pelo Mundo, verifica-se que a maioria delas utiliza alimentos fermentados numa base diária. Estes alimentos são fundamentais para uma boa digestão e para a criação de uma flora intestinal saudável. A nível mundial, existem mais de 3500 alimentos tradicionais fermentados, incluindo os alimentos típicos dos países, como o vinho, a cerveja, o pão, os iogurtes e os queijos e os enchidos. Em África, os alimentos produzidos a partir de amido fermentado (principalmente inhame e mandioca) representam uma parte importante da dieta local. Na Ásia, os produtos derivados de soja, arroz e peixe fermentados são consumidos diariamente (<http://www.eufic.org/article/pt/artid/mundo-pequeno/>).

O uso de produtos da fermentação, é uma prática tão antiga quanto a prática da agricultura. Na China, há mais de 3000 anos, já se conhecia o valor medicinal dos alimentos fermentados, onde o coalho de soja fermentada era utilizada para tratamento de infeções da pele. Da mesma forma, os índios da América Central utilizavam leveduras para tratar diversas infeções ([http://www.anew.com.br/flor anew\\_alimentos.htm](http://www.anew.com.br/flor anew_alimentos.htm)).

Os alimentos fermentados são conhecidos pelos seus efeitos probióticos (quer diretamente através da interação com o hospedeiro) pela sua ação biogénica (quer indiretamente como resultado da ingestão de metabolitos produzidos durante a fermentação). Existem vários estudos que demonstram que os probióticos não viáveis podem também ter efeitos benéficos em resultado da produção de metabolitos secundários (como vitaminas do complexo B, péptidos bioativos, exopolissacáridos, bacteriocinas e

ácidos fracos) durante a fermentação, sobretudo por bactérias ácidas-láticas mas também em resultado da ação de leveduras e fungos filamentosos (Vinderola, 2008).

Na Europa, os alimentos fermentados mais utilizados desde sempre são os alimentos à base de vegetais, laticínios e carne tais como os pickles, o chucrute e o iogurte (nos países de Norte), as azeitonas, os queijos e os enchidos (nos países Mediterrânicos) e também bebidas alcoólicas como a cerveja e o vinho processados de forma natural ([http://www.e-macrobiotica.com/artigos\\_e\\_multimedia/artigos/alimentacao](http://www.e-macrobiotica.com/artigos_e_multimedia/artigos/alimentacao)).

A crescente utilização destes produtos fermentados nos países ocidentais a par das preocupações com questões de segurança deu lugar à transformação do seu processo de produção, levando a que todo o processo industrial e tecnológico de fermentação esteja cada vez mais sofisticado. No entanto, mesmo na Europa ainda existem regiões onde os produtos são feitos manualmente nas quintas tradicionais sendo a forma de produção tradicional, em alguns casos, um dos requisitos para que sejam considerados produtos tradicionais certificados (Caplice e Fitzgerald 1999).

Em contrapartida, no Oriente, usa-se o Miso (pasta de soja), o Shoyu (molho de soja), o Umeboshi (pickle de ameixa), o tempeh (produto fermentado a partir da soja, alimento tradicional da Indonésia) e o Saké (vinho de arroz), entre outros (<http://macroexotic.com/culinaria/artigos/alimentos-fermentados>).

Nos países ocidentais, produtos como o tempeh e o miso, só entraram na dieta nos anos 70 (principalmente na América), quando a alimentação natural ficou popular devida a três movimentos: substitutos da carne, dieta vegetariana e produtos de soja. A popularidade dos produtos fermentados aumentou devido às suas propriedades nutricionais. No caso do tempeh, devido a sua rica fonte de proteína (19%) e por ser um dos poucos alimentos a base de plantas que contém vitamina B (Hutkins, 2006).

Em Portugal, sobretudo na última década, o consumo de produtos fermentados de soja têm vindo a crescer. Produtos como o tofu e o leite de soja já fazem parte da dieta de muitos portugueses. Os restantes produtos, como o miso e tempeh revelam também um crescimento em termos de consumo e aceitação.

### **2.3.2. Tipos de Alimentos fermentados**

Existem diferentes tipos de alimentos fermentados de acordo com os substratos utilizados, sendo os mais conhecidos: o iogurte, queijo, vinho, cerveja, e o pão que nos acompanham desde sempre. Outros alimentos fermentados começam agora a ganhar

grande visibilidade devido às suas propriedades, tais como o tempeh, miso, sake ou a kombucha.

Steinkraus (1997), classificou as fermentações de acordo com as seguintes 7 categorias: fermentação para a produção de substitutos de carne à base de proteína vegetal texturizada (Tempeh, Ontjom); fermentações à base de elevadas concentrações de sal (molho de soja, miso); fermentações ácido-láticas (iogurtes, chucrute, queijos, pickles); fermentações alcoólicas (vinho, cerveja, sake); fermentações acéticas (vinagre, kombucha); fermentações alcalinas (natto); Pães fermentados com leveduras e com fermento natural.

### **2.3.3. Propriedades dos alimentos fermentados**

A fermentação é a conversão, mediada por microrganismos, de uma fonte nutritiva, normalmente açúcar, em produtos orgânicos mais simples (Scott e Sullivan, 2008). A fermentação converte nutrientes como os açúcares principalmente em ácido lático, ácido acético e etanol. Quando as matérias-primas são de origem alimentar o resultado da fermentação é a produção de um dos chamados alimentos fermentados (Barros, 2010; Liu *et al*, 2001).

Os processos de fermentação de vegetais e leguminosas, resultam num aumento significativo da sua digestibilidade e num decréscimo dos compostos tóxicos, bem como num aumento de compostos com capacidade para controlar a população de microrganismos potencialmente patogénico, aumentando o valor nutricional e o potencial enquanto alimentos funcionais. Assim, o processo de fermentação permite aumentar o período de conservação, acrescentar valor nutricional, acrescentar propriedades funcionais aos alimentos, melhorar e diversificar as propriedades organolépticas da matéria-prima base, diversificar a dieta, e aumentar o valor económico dos produtos produzidos (Hutkins, 2006).

#### ***2.3.3.1. Papel dos alimentos fermentados na conservação de alimentos***

As tecnologias modernas de processamento de alimentos dependem de uma vasta gama de tecnologias de conservação de modo a assegurar que o produto se mantém num nível aceitável de qualidade desde o seu fabrico até ao tempo de consumo (Ross *et al*, 2002).

Se não se tomar precauções especiais, a maioria dos alimentos frescos alteram-se rapidamente. No passado, uma das principais preocupações da humanidade foi prolongar a duração da conservação dos produtos alimentares após a sua colheita, para assegurar um fornecimento suficiente durante todo o ano (Lacasse, 1999).

Os meios de conservação utilizados hoje em dia visam retardar ou impedir a deterioração dos produtos alimentares, preservando ao mesmo tempo, tanto quanto possível as suas qualidades nutricionais e organoléticas (Lacasse, 1999).

### ***2.3.3.2. Papel dos alimentos fermentados na digestibilidade e funcionalidade dos alimentos***

Durante o processo de fermentação, proteínas complexas, amidos e gorduras são degradadas em componentes mais simples, e algumas moléculas são alteradas tornando-se mais digeríveis, aumentando assim a digestibilidade global do alimento. Alguns alimentos fermentados, contêm microrganismos probióticos também eles associados a uma melhoria da nossa capacidade de digestão (<http://pt.scribd.com/doc/16830780/ALIMENTOS-FERMENTADOS>).

A fermentação constitui um processo que origina alterações químicas, biológicas e enzimáticas nos alimentos aumentando a sua digestibilidade e valor nutricional, por ação direta dos microrganismos envolvidos ou dos produtos que estes produzem (Barros, 2009). Os microrganismos que intervêm na produção de alimentos fermentados:

- Produzem enzimas que facilitam a digestão correta dos alimentos, promovem a absorção correta dos nutrientes, nomeadamente de minerais como o ferro e o zinco e ativam a sintetização de várias moléculas, nomeadamente vitaminas;
- Possuem bactérias denominadas saprófitas, que são benéficas no repovoamento do tubo intestinal, ajudando a regularizar a sua flora e a manter a correta permeabilidade da sua membrana.
- Estimulam as defesas imunitárias, ajudando a tratar várias patologias e impedindo o aparecimento de outras.

Os processos de fermentação de vegetais e leguminosas, ajudam no aumento do valor nutricional e no potencial enquanto alimentos funcionais. Com a fermentação, a qualidade das proteínas aumenta (ou seja, as proteínas contidas no alimento ficam mais adaptadas às nossas necessidades) (Granato *et al*, 2010) o conteúdo em lípidos diminui e o conteúdo em vitaminas aumenta (nomeadamente as vitaminas do complexo B), ao passo que simultaneamente se reduz o teor de fatores anti nutricionais (Kuo *et al*, 1995). Para além disso, a digestibilidade do amido aumenta [Oyarekua, 2010; Elmoneim *et al*, 2004], o ácido fítico é degradado [Okpala e Ekwe, 2013; Egoulety e Aworh, 2003], o inibidor da tripsina é inativado [Egoulety e Aworh, 2003; Prinyawiwatukul *et al*, 1996], e o conteúdo em oligossacáridos responsáveis pela flatulência (como a estaquiose e rafinose) reduz-se significativamente [Moy e Chou, 2010]. E ainda, com a fermentação ocorre uma maior

absorção de diferentes minerais e em alguns casos, há um aumento da riqueza proteica do alimento.

A fermentação não só torna os alimentos mais digeríveis, como aumenta o seu valor nutricional. Ao sintetizarem vitaminas e enzimas, os microorganismos fermentativos aumentam a proporção de micronutrientes essenciais ao corpo humano. Cem gramas de farinha de soja, por exemplo, contêm em média 0,2 microgramas de vitamina B12, na medida que uma quantidade equivalente de tempeh pode chegar a fornecer de 1,5 a 6,3 microgramas da mesma vitamina. Não bastasse a facilidade com que são digeridos, os alimentos fermentados também auxiliam na digestão dos outros componentes da refeição. <http://universoalimentos2.blogspot.pt/2010/08/missosho-yu-e-os-alimentos-fermentados.html> A fermentação pode contribuir para a obtenção de alimentos mais nutritivos, saborosos e fáceis de digerir. Podem também potencializar a segurança alimentar, uma vez que ajudam a conservar os alimentos e a prolongar a sua duração (tempo de prateleira), reduzindo, desta forma a necessidade de refrigeração ou de outros métodos de conservação de elevado consumo energético. (<http://www.eufic.org/article/pt/artid/mundo-pequeno/>).

#### ***2.3.3.3. Papel dos alimentos fermentados na diversificação da dieta e propriedades organoléticas dos alimentos***

O processo de fermentação de matérias-primas alimentares para além de aumentar a sua segurança e digestibilidade confere ainda propriedades organoléticas ao alimento distintas das da matéria-prima que lhe deu origem.

Durante o processo de fermentação ocorrem alteração enzimática que modificam a textura do alimento conferindo-lhe propriedades físicas muito diferentes da matéria-prima inicial (veja-se por exemplo a transformação de leite em iogurte e em queijo). Para além disso, são produzidos uma série de compostos aromáticos que conferem uma enorme variedade de sabores e aromas, que leva a que uma mesma matéria-prima possa originar produtos com características organoléticas muito diversas. É o caso por exemplo dos queijos e dos enchidos, mas também de muitos produtos orientais à base de soja e arroz. A repentina popularidade de alimentos fermentados, entre eles, o tempeh, deve-se, em parte, ao interesse na cozinha vegetariana e em produtos substitutos da carne (“faux” meats) (Hutkins, 2006) e à variabilidade que permite introduzir na dieta dos consumidores.

#### ***2.3.3.4. Papel dos alimentos fermentados no aumento do valor económico das matérias-primas***

A maioria dos alimentos fermentados é produzida a partir de matérias-primas com baixo valor económico, como seja o leite, a carne, os vegetais, o arroz ou a soja e outras leguminosas.

Através do processo de fermentação estas matérias-primas são convertidas em produtos alimentares de elevado valor acrescentado como sejam os queijos, vinho, enchidos ou o molho de soja. A fermentação permite assim para além dos benefícios anteriores já referidos, transformar matérias-primas básicas em “petiscos” alguns deles especialmente dirigidos a um mercado “gourmet”.

### **2.3.4. Alimentos fermentados orientais**

Ao contrário do que aconteceu no mundo ocidental, em que se deu uma industrialização significativa dos processos de produção, muitos dos produtos fermentados orientais resultam ainda de processos artesanais e produção em pequena escala, só agora se iniciando a sua industrialização (Rosa *et al*, 2009).

Apesar de partilharem objetivos de conservação, aumento da diversidade e melhoria das características funcionais dos alimentos fermentados ocidentais, os alimentos fermentados orientais apresentam diferenças significativas em relação a estes.

Em primeiro lugar, as matérias-primas a partir dos quais são produzidos são produtos locais, normalmente de origem vegetal, logo necessariamente diferentes dos produtos ocidentais, sendo os principais substratos fermentáveis o amido e outros polissacáridos. Em consequência disto, os processos fermentativos e muito da microbiota envolvida são também diferentes, iniciando-se normalmente com um processo de hidrólise dos polissacáridos de forma a disponibilizar os açúcares mais simples que são depois usados pelos microrganismos fermentativos, seguido de um processo fermentativo propriamente dito em que os açúcares disponibilizados após a primeira etapa são convertidos em ácido acético, ácido láctico e etanol (Rosa *et al*, 2009).

#### ***2.3.4.1. Alimentos fermentados à base de leguminosas***

Os seres humanos usavam o que a natureza provia, caçavam animais e colhiam frutos, raízes e alguns cereais. No século XVIII, a população alimentava-se de cerca de 240 espécies diferentes de plantas e, no percurso histórico do ser humano, cerca de 3000 espécies de plantas foram utilizadas como alimento. A soja é uma destas plantas de

consumo milenar. A população da Ásia oriental consome soja há mais de 2000 anos, como alimentos tradicionais (Rosa *et al*, 2009).

Muito embora as bactérias lácticas e as leveduras que fazem fermentação láctica e fermentação alcoólica sejam os principais organismos envolvidos na produção de produtos fermentados ocidentais, existem muitas outras bactérias, fungos filamentosos e leveduras que podem contribuir para o flavor, textura, aspeto e outras propriedades funcionais dos alimentos fermentados. Este facto é particularmente significativo no caso de muitos alimentos fermentados orientais à base de arroz e de soja como o sake, o miso, o molho de soja e o tempeh.

Nos países orientais, estes produtos têm um importante papel nutricional como fonte de proteínas na dieta da população (Rosa *et al*, 2009).

As leguminosas (Figura 1) são uma fonte rica, e de baixo custo, de proteínas e nutrientes para uma grande parte da população mundial. Mas o seu valor nutritivo é limitado pela presença de substâncias tóxicas incluindo oligossacarídeos, enzimas inibidoras, fitatos, polifenóis e lectinas (Egounlety e Aworh, 2003). Mesmo assim, as leguminosas, produtos de origem vegetal, são a base das refeições em muitos países.



**Figura 1 - Diferentes leguminosas**

Fonte: [http://www.nutrociencia.com.br/upload\\_files/arquivos/leguminosas.pdf](http://www.nutrociencia.com.br/upload_files/arquivos/leguminosas.pdf)

## 2.4. O Tempeh

O tempeh (Figura 2) é um alimento fermentado por um fungo filamentosos, normalmente *Rhizopus oligosporus*, cuja matéria-prima principal é feijão soja, este produto teve origem na indonésia, há muitos séculos atrás, onde continua a ser o principal alimento base e uma fonte de proteína diária de baixo custo onde é consumido em substituição da carne, representando um consumo *per capita* de 15 g/pessoa/dia e uma produção anual superior a 500 milhões de quilogramas de tempeh por ano. O fabrico deste alimento tradicional da Indonésia consiste em transformar o feijão cozido e descascado num bolo sólido e compacto através do crescimento de um fungo filamentoso (Sparriga e Owens, 1999), sendo a sua produção na Indonésia ainda maioritariamente artesanal (Hutkins, 2006).



**Figura 2 - Tempeh cru**

Fonte: <http://www.jamesandmatt.com.au/2013/01/totally-tempeh-local-brisbane-tempeh.html>



Para além da soja, tempeh também pode ser produzido a partir de várias outras leguminosas como por exemplo o feijão mungo, o grão ou a ervilha (tempeh de feijão, ervilha e grão) (Kuswanto, 2005) e cereais, por exemplo a cevada, através de fermentação com o mesmo tipo de fungo filamentoso (Berg *et al*, 2001; Feng *et al*, 2005).

A partir da segunda metade do século XX, o consumo de tempeh expandiu-se a alguns países ocidentais, nomeadamente nos EUA, devido ao aumento de indivíduos vegetarianos ou com dietas sem carne (Hutkins, 2006). Mais recentemente, o consumo de tempeh tem vindo a aumentar rapidamente quer nos Estados Unidos da América quer em países europeus, especialmente na Holanda e Alemanha, em virtude da funcionalidade fisiológica do tempeh [Hutkins, 2006; Kuswanto, 2005].

A grande popularidade do tempeh deve-se essencialmente às suas propriedades nutricionais, não só pelo seu elevado teor em proteína e sais minerais resultantes da soja. Para além disso, este produto fermentado possui propriedades organolépticas interessantes, com um sabor parecido ao da carne assada sobretudo quando frito (figura 3) ou salteado em resultado das reações de Maillard resultantes (Hutkins, 2006; Kats, 2003).



**Figura 3 - Tempeh frito**

Fonte: <http://bushwickfoodcoop.wordpress.com/buying-club/featured>

A produção de tempeh envolve duas fermentações distintas. A primeira fermentação, que ocorre durante a fase de demolha, é bacteriana, e resulta na acidificação que impede o crescimento de *Bacillus cereus* (Nout e Rombouts, 1990). A segunda é fúngica e resulta no crescimento do micélio de *Rhizopus oligosporus* nos cotilédones do feijão soja (Varzakas, 1998).

#### **2.4.1. Processo de produção**

O processo de produção do tempeh pode ser considerado uma fermentação em estado sólido e é relativamente simples e rápido.

Uma vasta gama de métodos de processamento de tempeh tem vindo a ser descrito em diferentes localidades e países. As fases essenciais na preparação de tempeh incluem a limpeza dos feijões, hidratação/fermentação ácida (demolha), descasque, cozedura parcial, drenagem, arrefecimento, secagem da superfície, inoculação com cultura de arranque,

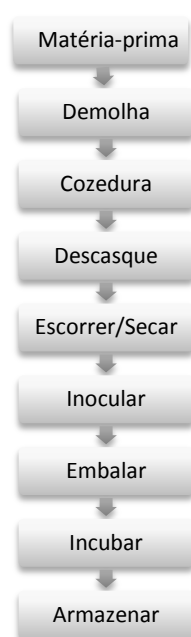
incubação (fermentação), recolha e processamento (Kuswanto, 2005). A matéria-prima básica mais comum para este produto é o feijão de soja.

Existem diferentes métodos de produção de tempeh (Tabela 1). Os passos básicos para a produção estão esquematizados na Figura 4.

Fluxograma de 7 métodos							
Etapa	1	2	3	4	5	6	7
1	Descascar	Ferver	Demolha	Ferver	Ferver	Demolha	Demolha
2	Lavar	Demolha	Descascar	Demolha	Arrefecer	Ferver	Ferver
3	Ferver	Descascar	Lavar	Descascar	Descascar	Lavar	Arrefecer
4	Escorrer	Lavar	Ferver	Lavar	Lavar	Ferver	Descascar
5	Arrefecer	Escorrer	Escorrer	Ferver	Demolha	Arrefecer	Lavar
6	Inocular	Inocular	Arrefecer	Escorrer	Ferver	Descascar	Demolha
7	Embalar	Embalar	Inocular	Arrefecer	Escorrer	Lavar	Ferver
8	Incubar	Incubar	Embalar	Inocular	Arrefecer	Escorrer	Escorrer
9			Incubar	Embalar	Inocular	Inocular	Arrefecer
10				Incubar	Embalar	Embalar	Inocular
11					Incubar	Incubar	Embalar
12							Incubar

**Tabela 1: Alguns métodos tradicionais de preparação comercial de tempeh a partir de feijão soja**  
(Fonte: Kuswanto, 2005)

**Nota:** Se só se efetuar uma fervura esta demora entre 60 a 120min (cozedura), se forem efetuadas duas fervuras, a primeira será de 30 min e a segunda 90 a 120 min (Kuswanto, 2005).



**Figura 4 - Diagrama do processo de produção de tempeh em pequena escala**

#### **2.4.1.1. Preparação da matéria-prima**

O feijão soja é a matéria-prima tradicionalmente usada no fabrico do tempeh. No entanto, para além do tempeh tradicional, existem outros tipos de tempeh produzidos a partir de outras leguminosas tais como o feijão, o grão ou a ervilha (Kuswanto, 2005).

O primeiro passo na produção de tempeh é a remoção dos feijões de soja danificados ou deteriorados (Hutkins, 2006). Após esta escolha, o feijão de soja e qualquer outro substrato é demolhado, cozido, inoculado e incubado. Esta etapa tem como finalidade deixar a matéria-prima nas condições necessárias ao desenvolvimento do produto.

##### **Demolha**

A demolha, tal como o descasque e a cozedura, é um dos processos que leva a uma melhoria efetiva do valor nutricional dos legumes (Egounlety e Aworh, 2003).

Demolhar o feijão durante a noite em grande quantidade de água torna o descasque mais fácil, o feijão consegue absorver, aproximadamente, o seu peso seco de água. O que resulta num tempeh com uma textura mais suave [Katz, 2003; Kuswanto, 2005].

A demolha é um processo que consiste em mergulhar as amostras em água, este processo dura 24 a 48h, geralmente durante a noite. É durante este processo que bactérias lácticas endógenas crescem e produzem ácidos que baixam o pH (até aos 4,5-5,3) que, geralmente restringe o crescimento de bactérias indesejadas bem como potenciais patogénicos (Hutkins, 2006), sem que a produção de ácidos fracos afete, posteriormente o crescimento do fungo, mas prevenindo o crescimento de bactérias indesejáveis que podem deteriorar o tempeh (Kuswanto, 2005).

Segundo Hutkins (2006), algumas destas bactérias indesejáveis podem sobreviver à etapa da demolha mesmo em condições ácidas. Para promover a acidificação a água de demolha pode ser acidificada com a adição de ácido láctico ou ácido acético.

##### **Cozedura**

Este processo tem como finalidade cozer parcialmente o feijão, bem como facilitar a hidratação e remoção da casca (que começa a ser libertada), resultando num tempeh com um sabor agradável e uma boa textura (Kuswanto, 2005).

O processo de cozedura faz com que mais tarde o substrato se liberte e deixe acessível os nutrientes necessários ao desenvolvimento do fungo. O aquecimento húmido geralmente leva à destruição do fator anti nutricional inibidor da tripsina (Steinkraus, 1979; Hutkins, 2006).

A cozedura promove a extração de nutrientes solúveis e inativa microrganismos que de outra maneira poderiam interferir com o subsequente processo de fermentação (Hutkins, 2006).

#### Descasque

O processo de remoção da casca tem por finalidade facilitar o desenvolvimento do fungo, ou seja, permitindo o acesso aos nutrientes que necessita.

A forma mais antiga de remover as cascas, praticada em pequenos fabricos tradicionais, envolve esfregar os feijões com as mãos (ou mesmo os pés), e separar as cascas por flutuação. No entanto, o descasque manual tem vindo a ser substituído por vários tipos de moinhos em que se pode descascar feijões secos ou molhados (Hutkins, 2006).

O descasque dos feijões molhados é ainda hoje efetuado em quase todas as pequenas fábricas de tempeh na indonésia (Kuswanto, 2005).

#### Escorrer/secar

Antes da inoculação deve-se escorrer e secar o substrato de modo a reduzir a humidade do grão. Esta etapa é bastante importante, dado que um dos problemas mais comum com o tempeh é o excesso de humidade que impede o crescimento do fungo, originando um produto não comestível (Katz, 2003).

#### **2.4.1.2. Inocular**

Depois de cozer, escorrer e secar o substrato, procede-se à sua inoculação com uma porção de farinha, previamente estipulada e preparada, com esporos de *Rhizopus oligosporus* ou diretamente com esporos do mesmo fungo (Kats, 2003).

A produção tradicional de tempeh é realizada inoculando a leguminosa cozida com uma mistura de culturas pelo qual se dá o nome de “usar”. Atualmente, o inóculo mais comum para fabricar tempeh consiste apenas em  $10^7$  a  $10^8$  esporos da cultura *Rhizopus microsporus* var *oligosporus*, o que corresponde a uma proporção de cerca de 1g por Kg de feijões secos (Hutkins, 2006), o que corresponde a 5g de inóculo por 100g de feijão molhado. O inóculo deverá ser polvilhado na superfície dos feijões e completamente misturados para distribuir os esporos pela área de todos os feijões (Kuswanto, 2005).

#### **2.4.1.3. Embalar**

Depois de inocular o substrato, é importante embala-lo para se obter o produto final no qual um micélio branco desenvolveu abundantemente e ligou os feijões de modo a

formar um bolo compacto. Deve-se manter o equilíbrio entre a humidade dos feijões e o contato suficiente dos feijões com o ar. No entanto, o contato com o ar não deverá ser completo, uma vez que pode causar desidratação dos feijões resultando num micélio pobre, crescido com excessiva esporulação. Por outro lado se o fungo crescer com falta de ar, o crescimento é inibido, e neste caso o crescimento do micélio é pobre no centro do bolo (Kuswanto, 2005).

O modo tradicional de embalar o tempeh é acondicionar pequenas quantidades de feijão inoculado em folhas de bananeira, hibiscos ou tubos de bambu (figura 5). No entanto os sacos de plástico, fechados, são a forma mais comum de embalar (figura 6) (Kuswanto, 2005).

O embalamento consiste em colocar a matéria-prima inoculada num recipiente em que seja possível moldá-la e deixá-la mais compacta. Depois de embalada efetuam-se pequenos furos, uniformes, no saco, que têm como objetivo permitir a respiração do fungo durante a fermentação.



Figura 5: tempeh embalado em casca de bananeira

Fonte: <http://en.wikipedia.org/wiki/Tempeh>

Figura 6: tempeh embalado em sacos de plástico

Fonte: <http://www.jamesandmatt.com.au/201>



#### 2.4.1.4. Fermentação

A última etapa essencial na produção de tempeh é a fermentação, durante a qual o fungo se desenvolve na massa do preparado de feijões sob condições ótimas (Kuswanto, 2005). Esta etapa dura um ou dois dias, em ambiente quente (entre 25 e 37°C), sendo os feijões cobertos por um micélio que confere consistência aos produtos, altura em que a fermentação é considerada completa (Hutkins, 2006).

Dado que *R. oligosporus* é um fungo aeróbio estrito, a incubação é obrigatoriamente realizada em presença de oxigénio, que permite o crescimento rápido do micélio, mas sem esporulação. Na prática, isto é conseguido por perfuração do recipiente com pequenos furos, de aprox. 1 mm de diâmetro, uniformemente distribuídos. Na ausência de perfuração, ocorre o crescimento anaeróbico de espécies bacterianas e de leveduras, e apenas pequenos micélios irão crescer até que todo o oxigénio seja consumido. Por outro lado, se

os furos forem demasiado grandes e juntos, o crescimento fúngico será extremamente rápida e o calor resultante irá aumentar a temperatura do substrato para além da ótima podendo tornar o produto pastoso (Nout e Rombouts, 1990).

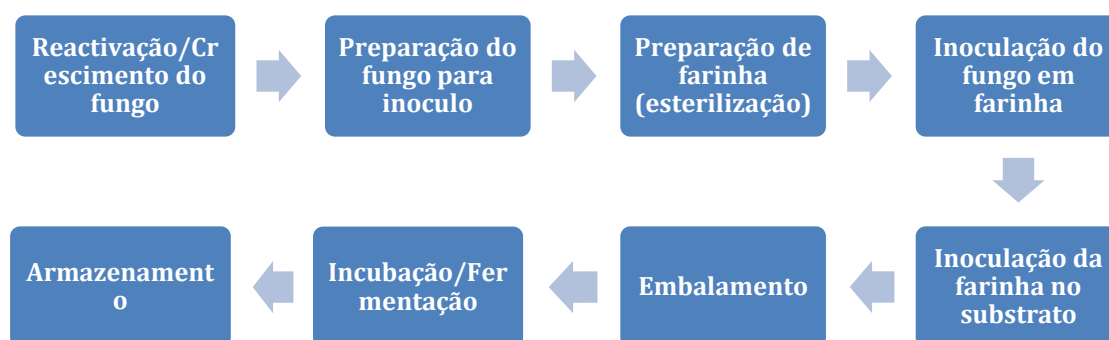
No final o tempeh deverá ter um odor agradável, tipo cogumelos ou as bebés (Kats, 2003). No entanto, é importante que a fermentação termine antes do fungo começar a esporular, uma vez que o aparecimento de coloração preta ou cinzenta é geralmente pouco atrativa para o consumidor (Hutkins, 2006).

#### **2.4.1.5. Armazenar**

O armazenamento é feito num local que permite a estabilidade de crescimento do fungo, ou seja, num local que impeça o crescimento contínuo do fungo. O armazenamento ideal seria em local com baixa temperatura, no frigorífico ou no congelador, inibindo em simultâneo o crescimento adicional do fungo e qualquer processo fermentativo por parte da microbiota que possa ainda estar presente.

#### **2.4.2. Preparação do inóculo**

A preparação do inóculo inicia-se com o processo de “refrescar” o fungo, passando pela inoculação da farinha e finalizando com a obtenção da farinha inoculada, ou seja, o inóculo pronto para ser inoculado nos feijões. Na figura 7 apresenta-se o diagrama do processo de obtenção do inóculo.



**Figura 7 - Etapas do processo de obtenção do inóculo**

O processo de obtenção de inóculo tem por objetivo preparar o inóculo e deixá-lo operacional até o seu uso ser necessário. Este processo engloba fases tais como a reativação e crescimento do fungo bem como o procedimento de inoculação para reproduzir o fungo.

### Reativação do fungo

O desenvolvimento de esporos de fungos pode ser arbitrariamente distinguida em algumas etapas, como a formação, maturação, dormência, após amadurecer, ativação e germinação (Griffin, 1994).

Como qualquer outro fungo, a dormência do *Rhizopus oligosporus* ocorre especialmente durante o período de armazenamento, sendo que a dormência pode ser uma das razões do tempo de vida limitado das culturas de arranque usadas para o fabrico de tempeh (Thanh e Nout, 2004).

A interrupção da dormência do fungo tem como finalidade melhorar a viabilidade do *Rhizopus oligosporus*. Esta etapa é crucial para a aplicação de culturas de arranque armazenadas, em produções à base de esporos de fungos uma vez que muitos dos esporos ativos, mas não todos, estão metabolicamente viáveis em termos de crescimento, isto é, são capazes de germinar e produzir micélio. Só os esporos viáveis poderão originar micélio e consequentemente crescer e produzir tempeh, sendo este um dos fatores a ter em conta na contabilização do número de esporos a inocular (Thanh e Nout, 2004).

Durante esta etapa prepara-se uma suspensão de esporos incubando-os a temperatura próxima da temperatura ambiente, que mais tarde será utilizada para inocular a farinha que será usada como inóculo no fabrico de tempeh.

### Inoculação e crescimento do fungo

A fermentação primária é mediada pelo crescimento de *Rhizopus oligosporus*, o qual pode ser adicionado aos feijões de diversas formas. Algumas das formas de se inocular são: através da adição como cultura pura de esporos, através da adição de farinha de tempeh seco, ou através da forma mais usada no fabrico tradicional, utilizando o “usar” inoculando uma cultura indígena de esporos de *Rhizopus* obtida a partir de plantas de hibiscos (Hutkins, 2006). Pode-se também inocular em arroz cozido ou em farinha, em qualquer dos casos, são incubados até atingir o crescimento desejado, e só depois pode ser utilizados para inocular os feijões.

No caso de o inóculo ser composto por farinha inoculada com *R. oligosporus*, o processo de crescimento ocorrido na farinha, dá-se durante o período de incubação e dura aproximadamente 5 dias a 28-30°C, ou até começarem a aparecer esporos escuros.

### Armazenamento

O armazenamento é feito de modo a estabilizar o crescimento dos fungos, colocando-os em dormência, normalmente por ação de frio.

### 2.4.3. Microbiota do tempeh

A qualidade do tempeh pode ser afetada devido a contaminações com bactérias, fungos e leveduras que se desenvolvem durante o processo de fermentação (Mazas e Pérez, 2003).

A superfície dos feijões crus contém uma grande variedade de bactérias Gram positivas e Gram negativas, incluindo *Lactobacillus casei* e outras bactérias ácido-láticas; Enterococci; Staphylococci; Streptococci; Bacilli; *Enterobacter*, *Klebsiella*, entre outros coliformes. Leveduras, tais como as dos géneros *Pichia*, *Saccharomyces* e *Candida*, também podem estar presentes (Hutkins, 2006).

A composição da microbiota do tempeh inclui um grande número de bactérias e leveduras para além dos fungos. As interações microbianas são claramente importantes durante a fermentação do tempeh (Kuswanto, 2005) embora em fases distintas deste processo.

Mazas e Pérez (2003), concluíram que existe uma necessidade de manter um nível alto de praticas sanitárias durante a produção e de refrigerar adequadamente o produto uma vez terminada a fermentação.

#### 2.4.3.1. Fermentação láctica (pH)

Durante a demolha, a sacarose, a estaquiose e a rafinose difundem-se para a água. Estes açúcares são depois parcialmente hidrolisados pelas invertases e glucosidases, dando origem a glucose e frutose que podem ser usados como fonte de carbono e energia para o crescimento/metabolismo fermentativo da microflora composta por bactérias ácidas-láticas presentes naturalmente no feijão de soja (Hutkins, 2006). Esta fermentação láctica causa uma diminuição do pH da água de demolha do feijão de soja.

O pH da água de demolha, quer seja acidificada ou não, geralmente diminuirá para 4,5 a 5,0 devido ao ácido láctico e misturas de fermentações ácidas. Embora a produção de tempeh dependa, claramente, do crescimento de *Rhizopus oligosporus*, a fermentação que ocorre durante a demolha dos feijões é também essencial sobretudo para controlo de potenciais microrganismos patogénicos que possam existir no grão incluindo a *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus* e *Clostridium botulinum* (Hutkins, 2006).

#### 2.4.3.2. Fermentação por fungos filamentosos

O tempeh é um alimento de alto valor proteico, elaborado de soja fermentada, processo em que ocorre a obtenção de energia através da quebra da glicose e de outros



substratos da soja, altamente nutritivo porque contém fitoquímicos tais como as isoflavonas, as saponinas, etc.

A fermentação do tempeh é caracterizada por mudanças bioquímicas resultantes da atividade muito proteolítica e lipolítica da proliferação do micélio no meio dos grãos de feijão. Ácidos gordos são libertados durante a fermentação resultando na hidrólise de mais de 30% de lípidos neutros. As consequências nutricionais significativas desta ação enzimática são o aumento de digestibilidade do produto e um acompanhamento do elevado nível de ácidos gordos livres e de proteína solúvel (Kuswanto, 2005).

O fungo filamentoso presente no tempeh é *R. oligosporus*. O fabrico de tempeh depende claramente do crescimento deste fungo que irá dar origem ao micélio em volta dos grãos de soja, conferindo firmeza ao bolo.

Durante o crescimento aeróbio do fungo, para além do desenvolvimento do micélio, *R. oligosporus* hidrolisa e consome os açúcares, como a estaquiose e rafinose, disponíveis e produz uma série de enzimas lipolíticas e proteolíticas que levam à produção de péptidos com propriedades biocidas e à redução significativa do teor de gordura do feijão. São também produzidas vitaminas do complexo B.

#### **2.4.4. Nutrição e Segurança alimentar**

Entre as mudanças mais importantes que ocorrem durante a fermentação do tempeh, estão aquelas que afetam a qualidade nutricional do tempeh. A concentração da maior parte dos macronutrientes (proteína, gordura, hidratos de carbono) diminui à medida que os feijões de soja são convertidos em tempeh devido a hidrólise enzimática. Estas mudanças podem, em parte, contar para uma melhoria na qualidade nutricional (Hutkins, 2006).

O impacto nutricional de alimentos fermentados em doenças nutricionais pode ser direta ou indireta. A fermentação de alimentos que aumentam o conteúdo de proteínas ou melhoram o equilíbrio de aminoácidos essenciais ou a sua disponibilidade poderá ter efeitos curativos (Steinkraus, 1997).

De acordo com Hutkins (2006), a hidrólise de proteínas torna o tempeh mais digestível comparando com os feijões soja. Existe também uma diminuição de oligossacáridos, durante a conversão de soja em tempeh. Estes açúcares, que não são desejáveis devido a sua capacidade de causar flatulência, são removidos não pela fermentação mas sim por difusão durante as fases de demolha e cozedura.

Provavelmente a melhoria nutricional mais importante que ocorre durante a produção de tempeh é o aumento do conteúdo em vitaminas, em particular da vitamina B<sub>12</sub> que aumenta a sua concentração no tempeh, uma vez que a sua presença nos feijões é praticamente nula (Hutkins, 2006).

Para além disso, o fato de ocorrer uma fermentação láctica numa etapa inicial da produção de tempeh, leva à diminuição do pH e à produção de ácidos orgânicos que limitam o crescimento de potenciais microrganismos patogénicos. Os alimentos fermentados geralmente têm bom registo de segurança, mesmo nos países em desenvolvimento ou durante a produção caseira, em que os alimentos são manipulados por pessoas sem treino em microbiologia ou química, as vezes em condições pouco higiénicas e em ambientes contaminados (Steinkraus, 1997).

#### 2.4.5. Formas de embalagem e conservação

Todas as formas de embalagem devem permitir uma conservação adequada do seu conteúdo.

A forma de embalagem do tempeh, desde os tempos antigos é feita utilizando folhas de bananeira (figura 8) ou mesmo outras folhas tais como hibiscos e bambu. Recentemente a indústria usa sacos de plástico flexível, perfurados (figura 9). No entanto, as pequenas indústrias continuam a usar vários tipos de folhas especialmente de bananeira (Kuswanto, 2005). Este embalagem ocorre antes da incubação.

**Figura 8 - Embalamento de tempeh em folhas de bananeira**

(Fonte: [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Tempeh\\_tempe.jpg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Tempeh_tempe.jpg))



**Figura 9 - Tempeh embalado em sacos de plástico**

(Fonte: <http://withfriendship.com/user/cyborg/tempeh.php>)

Uma vez que o tempeh é um alimento perecível, depois de terminado o período de incubação/crescimento de *R. oligosporus*, deverá ser arrefecido ou seco o mais rápido possível para aumentar o seu tempo de prateleira. O tempeh embalado em sacos de

polietileno perfurado é, geralmente, embalado novamente, sem ser retirado no saco inicial, e sem que este esteja perfurado para uma distribuição segura (Shurtleff e Aoyagi, 1986).

Depois de incubação o tempeh deve ser, imediatamente, colocado no frigorífico ou congelador, não deve ser empilhado uma vez que pode provocar aquecimento, possibilitando que a fermentação continue, diminuindo o tempo de conservação (Shurtleff e Aoyagi, 1986).

## 2.5. *Rhizopus oligosporus*

O tempeh, também conhecido como tempe, é tradicional da Indonésia e produzido a partir de feijões soja através de uma fermentação com fungos zigomicetes, particularmente *Rhizopus oligosporus* (*R. microsporus* var. *oligosporus*) (Feng. *et al*, 2005).

Este género de fungo é bastante utilizado na Ásia para produzir produtos alimentícios e pela sua capacidade de produzir compostos fenólicos (Correia *et al*, 2004).

As principais vantagens de se utilizar *Rhizopus oligosporus*, resultam do fato de ser de fácil manipulação, capaz de crescer rapidamente em diferentes substratos e produzir grandes rendimentos de bioprodutos (Kuswanto, 2005). Os fungos do género *Rhizopus* são considerados como GRAS (Generally Regarded as Safe) pela FAO (2011).

Outras aplicações do *Rhizopus oligosporus* inclui a produção de enzimas industriais e no tratamento de resíduos e efluentes [Casey e Walsh, 2004; Iksari e Mitchell, 1994; Jin *et al.*, 1999 in Jennesen *et al*, 2008].

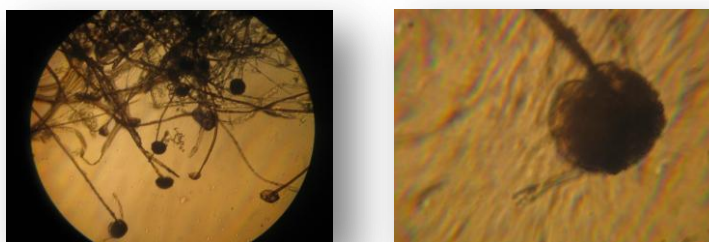


Figura 10 - Imagem de *Rhizopus oligosporus* no microscópio

### 2.5.1. Características gerais dos fungos

Existem diferentes tipos de fungos alguns deles patogénicos de plantas e animais mas também alguns que desempenham papéis muito importantes nos processos fermentativos, nomeadamente na produção de alimentos fermentados.

Todos os dias as pessoas são beneficiadas por produtos originados direta ou indiretamente de Fungos. Pode-se citar como exemplo a ação fermentativa de fungos, como

as leveduras e os bolores, na síntese de álcool etílico e dióxido de carbono, os quais são imprescindíveis na produção de bebidas como vinho e cerveja, alimentos como pães e massas em geral, bem como o tempeh (Silva e Coelho, 2006).

Os fungos são heterotróficos, saprófitas na sua maioria, que encontram nos alimentos os nutrientes necessários para o seu crescimento. Estes microrganismos têm uma organização celular do tipo eucariota, o que os distingue fundamentalmente das bactérias, isto implica que neles se distingue um núcleo celular verdadeiro (Lacasse, 1999).

Graças aos seus mitocôndrios, todos os fungos possuem capacidade de realizar o seu metabolismo energético por respiração aeróbica (Lacasse, 1999).

Fisiologicamente os fungos adaptam-se a condições mais severas do que a maioria dos microrganismos. Sendo pouco exigentes do ponto de vista nutritivo (Lacasse, 1999).

Segundo Lacasse (1999), os fungos têm necessidade em água menos elevada do que as bactérias, podem suportar uma maior pressão osmótica (alimentos muito açucarados ou muito salgados) e toleram uma gama mais ampla de pH.

O mesmo autor refere que a maioria dos fungos tem uma temperatura ótima de crescimento entre ao 20 e 30°C.

O crescimento e esporulação dos fungos dependem de fatores como a temperatura e pH, presença de oxigénio e luminosidade.

Os fungos, tipo fungos filamentosos, como é o caso de *Rhizopus oligosporus*, têm estruturas mais complexas, multicelulares, com diferentes aparências e cores e com uma estrutura básica, as hifas, que originam os esporos (FAO). Ao contrário das leveduras e das bactérias, que quando crescem em meio de cultura, crescem em superfície e fazem relevo para a parte aérea, os fungos filamentosos têm um micélio, conjunto de hifas, com relevo para a parte aérea e um crescimento para a profundidade do meio de cultura (Lacasse, 1999). O micélio que inicialmente é branco irá transformar-se num micélio mais escuro.

## **2.5.2. Características específicas de *Rhizopus***

### **2.5.2.1. Taxonomia e Características morfológicas**

O reino Fungi é dividido em 6 filos ou divisões, dos quais 4 têm importância nos alimentos, Zygomycota, Ascomycota, Basidiomycota, e Deuteromycota (Perdantini, 2012).

Os fungos do género *Rhizopus* sp. são classificados segundo Filo: *Zygomycota*, Classe: *Zygomycetes*, Ordem: *Mucolales*, Família: *Mucolaceae*, Género: *Rhizopus*. De entre as espécies do género *Rhizopus*, encontram-se as espécies *Rhizopus oligosporus*,

*Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus circicans*, *Rhizopus delemar*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus microsporus*, *Rhizopus formosa*, *Rhizopus stolonifer* (Miyaoaka, 2012).

*Rhizopus* pertence à divisão Zigomycota e os microrganismos pertencentes a esta categoria possuem micélio cenocítico (sem septos), a reprodução pode ser sexuada (zigósporos) ou assexuada (esporangiosporos). Nesta divisão estão incorporados outros fungos como o *Mucor* e *Thamnidium* (Perdoncini, 2012).

Este fungo, utilizado no fabrico de tempeh é caracterizado morfologicamente por ter hifas que crescem como uma estrutura ramificada, complexa com bordas irregulares. O crescimento de colónias de fungos em meios de cultura sólidos ocorre por extensão e ramificação das células filamentosas, as hifas, que crescem apicalmente. Os ramos vão se sobrepondo uns aos outros cobrindo áreas nos meios de cultura, formando redes radiais complexas (Diaz *et al*, 2010).

### **2.5.2.3. Características fisiológicas**

O *Rhizopus oligosporus*, tal como grande parte dos fungos podem ser encontrados onde quer que exista matéria orgânica disponível mas crescem melhor em ambientes húmidos e escuros. Quando o ambiente é muito seco, sobrevivem entrando num estado de repouso ou produzindo esporos que são mais resistentes.

A principal forma de armazenamento de fosforo nos cereais é sob a forma de fitatos (myo-inositol hexakisphosphate or IP6) (Reddy *et al.*, 1982). Durante a fermentação, o *Rhizopus oligosporus* produz fitase que degrada os fitatos e a aumenta a disponibilidade de minerais na cevada (Eklund-Jonsson *et al.*, 2006). De acordo com Wiesel *et al* (1997), *Rhizopus oligosporus* também produz ergosterol (provitamina D2) e algumas vitaminas.

Durante o processo de incubação com *Rhizopus oligosporus*, os feijões são cobertos por uma película branca, formando um bolo, e as enzimas libertadas pelo fungo tornam este produto rico em proteínas e mais digerível para o consumo humano (Jennessen *et al*, 2008).

Apesar de todos os esforços para controlar a contaminação fúngica, os fungos toxinogénicos são onipresentes na natureza e aparecem regularmente no abastecimento de alimentos em todo o mundo. O crescimento de fungos e a produção de micotoxinas ocorrem somente em condições favoráveis, que variam de espécie para espécie, dependendo da adaptabilidade destes (Rodrigues *et al*, 2012).

### 2.5.3. Produção de Micotoxinas e questões de segurança alimentar

As micotoxinas são geralmente definidos como produtos naturais de baixo peso molecular produzidos como metabolitos secundários por alguns fungos filamentosos, e que são tóxicos para os vertebrados em baixas concentrações (Paterson e Lima, 2010).

As micotoxinas, tóxicos para outros seres vivos, e o crescimento de bolores não se correlacionam com a produção de toxina. Os fatores ambientais (por exemplo, humidade, oxigénio, temperatura e composição de alguns tipos de substrato) parecem determinar se as micotoxinas são produzidas ou não. Devido à sua ubiquidade, os fungos que produzem micotoxinas podem estar presentes em grãos e outros alimentos (Meerdink, 2002).

Se por um lado, alimentos à base de fungos podem estar livres de toxinas, por outro lado, as toxinas podem estar presentes, formadas numa atividade anterior que já não esteja visível. Uma vez formada a toxina, esta é estável e não é afetada pelas variáveis ambientais normais (Meerdink, 2002).

O uso de *Rhizopus oligosporus* em fermentações de alimentos requer uma diferenciação entre fungos, que podem ser potencialmente prejudiciais. Os esporangiosporos (esporos), por exemplo são transportados no ar e a contaminação poderia assim, ocorrer facilmente, tornando a garantia de qualidade importante (Jennessen, 2008).

Dependendo da definição utilizada, e reconhecendo que a maior parte das toxinas fúngicas aparecem em famílias de metabolitos quimicamente relacionados, centenas de compostos são agora reconhecidos como micotoxinas, dos quais apenas um número reduzido regularmente recebe atenção como sendo ameaça para saúde humana e animal (Paterson e Lima, 2010).

O desenvolvimento de micotoxinas ocorre principalmente nas regiões tropicais e temperadas do mundo, dependendo das espécies de fungos. Os principais produtos alimentares afetados são cereais, nozes, frutos secos, café, cacau, especiarias, sementes oleaginosas, ervilhas secas, feijões e frutos carnosos, principalmente maçãs. As micotoxinas podem também ser encontradas em sumos de fruta, cerveja e vinho, resultante da utilização de cereais e de frutos contaminados na sua produção (Rodrigues *et al*, 2012).

O conhecimento sobre parâmetros intrínsecos e extrínsecos dos alimentos e das características ecofisiológicas de fungos, complementada com evidências sobre a composição e sucessão da microbiota em produtos em toda a cadeia de produção é um passo importante para a previsão de possíveis contaminações com micotoxinas (Rodrigues *et al*, 2012).

Finalmente, tem havido muito interesse sobre a segurança microbiológica e a possível presença de micotoxinas em tempeh. Como é o caso de outros alimentos fermentados por fungos, as estirpes selvagens ou de cultura pura utilizados para a produção de tempeh não produzem micotoxinas (Hutkins, 2006).

## 2.6. Bactérias Lácticas

As Bactérias lácticas, em particular, desempenham um papel dominante durante todo o processo de fermentação. Eles metabolizam os componentes químicos das matérias-primas e como tal contribuem para o valor nutritivo dos produtos, para melhorar o sabor e textura, e melhorar a digestibilidade. Além disso, eles também podem produzir compostos antimicrobianos e demonstrar propriedades probióticas (Tamang, 2010).

A utilização de bactérias lácticas tem sido bastante usada para a melhoria da alimentação dada a sua ampla aplicação numa vasta gama de alimentos fermentados. Estes microrganismos podem produzir uma grande variedade de metabolitos primária e secundária antagonista, incluindo os ácidos orgânicos, diacetil, CO<sub>2</sub>, até mesmo antibióticos tais como reuterocyclin produzido por *Lactobacillus reuteri*.

Além disso, os membros do grupo também podem produzir uma grande variedade de bacteriocinas, alguns dos quais têm atividade contra bactérias patogênicas alimentares como *Listeria monocytogenes* e *Clostridium botulinum* (Ross *et al*, 2002).

A ação conservante de estirpes de arranque no sistema de alimentos e bebidas é atribuído à ação combinada de vários metabolitos antimicrobianos produzidos durante o processo de fermentação. (Vuyst e Vandamme, 1994; Caplice e Fitzgerald, 1999).

### 2.6.1. Fermentação por bactérias lácticas

As fermentações alimentares têm sido efetuados à milhares de anos, tendo como resultado a existência de uma enorme variedade de alimentos fermentados, que vão desde os derivados de carne e produtos vegetais para os derivados de leite e produtos lácteos. Em cada caso, o processo de fermentação envolve a oxidação de hidratos de carbono que origina produtos que são principalmente ácidos orgânicos, álcool e dióxido de carbono (Ray e Daeschel, 1992).

A fermentação por bactérias lácticas é responsável por processar e conservar uma grande quantidade de alimentos para consumo humano garantindo a sua segurança (Steinkraus, 1997). As bactérias lácticas desempenham um papel essencial na produção e conservação de alimentos saudáveis que vão desde:

- Vegetais frescos fermentados, tais como repolho (chucrute / kimchi coreano) e pepino (pickles),
- Iogurte de cereal fermentado (Nigerian ogi / queniano uji),
- Massa pão e produtos tipo pão sem o uso de farinhas de trigo ou de centeio (indiano idli / Philippine puto)
- Leites fermentados (iogurte / queijo) e misturas de leite / trigo fermentadas (Kishk egípcio / Trahanas grego),
- Alimentos ricos em proteína e proteína vegetal substitutos da carne (tempeh Indonésia),
- Aminoácidos / peptídeo de molhos de carne aromatizados e pastas produzidas pela fermentação de cereais / leguminosas (miso japonês / molho de soja chinês),
- Misturas fermentadas de cereais / peixe / camarão (Philippine balao / balao; filipino burong dalag),
- Carnes fermentadas (salame europeus, etc) (Steinkraus, 1983).

A salga e a fermentação láctica continuam a ser métodos altamente desejáveis de tratamento e conservação de legumes, porque são de baixo custo, têm requisitos de baixa energia, tanto para o processamento e preparação de alimentos para consumo e produzem sabores altamente aceitáveis e diversificado para os seres humanos (Steinkraus, 1983).

### 2.6.2. Bioquímica

Bioquimicamente, a fermentação é o processo metabólico no qual os hidratos de carbono e compostos relacionados são parcialmente oxidados, o que resulta na libertação de energia. Consequentemente, ocorre a oxidação incompleta do composto original, que promove a libertação de apenas uma pequena quantidade de energia durante o processo. Os produtos da fermentação consistem em alguns compostos orgânicos, os quais podem ser mais reduzidos do que outros (Pombo, 2007).

Para além de produzir um micélio, que literalmente mantém os feijões juntos, o *Rhizopus oligosporus* é também responsável por causar as maiores alterações bioquímicas na composição da matéria-prima. Durante o período de incubação um terço da fração lipídica e um quarto da fração proteica são degradados (Hutkins, 2006). Durante a fermentação, o *Rhizopus* induz mudanças na composição nutricional do tempeh, nomeadamente a redução de fatores anti nutricionais e produção de vitaminas (Kuswanto, 2005).



Uma das mais importantes funções que o fungo tem no processo de fermentação é a síntese enzimática, no qual hidrolisa os constituintes do feijão soja e contribui para o desenvolvimento de uma agradável textura, flavor e aroma no produto (Hachmeister e Fung, 1993).

Apesar do limitado metabolismo das proteínas e dos aminoácidos ocorre uma acumulação de amónia durante a fermentação do tempeh de tal modo que o pH sobe de 5.0 para acima dos 7.0. Este aumento do pH durante a fermentação fúngica ressalva a importância da acidificação durante a fase de demolha uma vez que este processo é responsável pela inativação de potenciais patogénicos que podem estar presentes na matéria-prima (Hutkins, 2006).

A atividade das bactérias lácticas durante a demolha dos feijões pode ter um impacto direto na proliferação e possível formação de toxina de potenciais patogénicos e bactérias toxinogénicas no tempeh (Kuswanto, 2005).

## 2.7. Análise sensorial

No setor alimentar, a análise sensorial é de grande importância pois avalia a aceitação de um produto no mercado e a qualidade do produto, sendo parte inerente ao plano de controlo de qualidade de uma indústria.

Segundo o projeto de Norma Portuguesa 4263 (1994), podemos definir Análise Sensorial ou Exame Organolético como o “exame das características organoléticas de um produto pelos órgãos dos sentidos”, sendo, aí, organolética definida como o que “qualifica uma propriedade de um produto perceptível pelos órgãos dos sentidos”.

Análise Sensorial permite determinar as diferenças, caracterizar e medir atributos sensoriais dos produtos ou determinar se as diferenças nos produtos são detetadas e aceites ou não pelo consumidor. No desenvolvimento de produtos ou no controlo da qualidade, a compreensão, determinação e avaliação das características sensoriais dos produtos torna-se importante em muitas situações (Noronha, 2003).

De acordo com IFT (1981), os testes sensoriais classificam-se em:

Testes discriminatórios, em que são avaliadas as diferenças sensoriais entre dois ou mais produtos. Considera-se um só atributo, por exemplo, a doçura, comparando uma amostra com outra ou outras amostras (Noronha, 2003),

Testes descritivos, que permitem a avaliação dos atributos sensoriais de produtos e neste caso são utilizadas equipas treinadas de provadores.

Quando estamos interessados em qualidades sensoriais complexas e multidimensionais de um produto/amostra temos de utilizar métodos que permitam “o uso de termos descritivos para a avaliação dos atributos sensoriais da amostra e a intensidade de cada atributo”. Estes métodos são comumente designados por Perfil Sensorial (Noronha, 2003).

Os testes Afetivos ou Hedónicos têm como objetivo avaliar a aceitação e preferência dos consumidores em relação a uma ou mais produtos.

Nas provas hedónicas o provador indica a sua reação subjetiva sobre o produto, indicando se gosta ou não gosta do produto, se o aceita ou não, ou se o prefere a um outro produto. Estas provas apresentam uma grande variabilidade e são as provas cujos resultados são mais difíceis de interpretar, já que tratam de opiniões completamente pessoais, como se costuma dizer “cada cabeça sua sentença” ou “gostos não se discutem” (Noronha, 2003).

As escalas de classificação hedonística (figura 11) são usadas para avaliar o nível de agrado – preferência ou aceitação – pelo produto, manifestado por uma amostra da população-alvo do produto (organizada num painel de provadores). Tradicionalmente, as escalas hedonísticas compreendem 9 pontos ou palavras que traduzem outros tantos níveis de agrado e/ou desagrado (Esteves, 2009).



Figura 11 - escala de classificação hedonística

(Fonte: Esteves, 2009)

## 3. Material e Métodos

### 3.1. Estirpe, meios de cultura e condições de manutenção

No presente trabalho utilizou-se uma estirpe de *Rhizopus oligosporus* existente no laboratório de Bioenergética Microbiana. Esta estirpe foi fornecida pelo Instituto Nacional de Engenharia, Tecnologia e Inovação em 2007 e mantida congelada a -80°C.

A estirpe de *R. oligosporus* foi descongelada e inoculada em meio de cultura sólido de extrato de levedura/peptona/glucose (YPD, Anexo A1) usando agar como agente solidificante. A estirpe foi periodicamente repicada para nova placa do mesmo meio a fim de manter o fungo viável e ativo. Para tal, a partir de uma placa de 9 cm de diâmetro contendo o fungo, foi recolhida uma fração de micélio, ressuspensionado em 200uL de água estéril e inoculado numa placa de meio fresco. A placa foi incubada em estufa a 28°C até se observar crescimento abundante em toda a superfície do meio.

Para preparação do pré-inóculo (placa-mãe) com vista à sua utilização na preparação posterior do inóculo para tempeh foram testados dois meios: Potato Dextrose Agar (PDA) e Malt Extract Agar (MEA) (Difco) (Anexo A1).

Como meio de cultura, para produção do inóculo a utilizar na fabrico de tempeh, foi utilizada farinha de trigo esterilizada por autoclavagem 20 minutos a 121°C. Após esterilização a farinha foi seca numa estufa com circulação de ar (modelo Memmert) a 65°C durante 24 horas.

No caso da determinação do número de bactérias e de bactérias lácticas utilizaram-se respetivamente o meio sólido YPD (genérico) e o meio sólido MRS (específico de bactérias lácticas).

### 3.2. Métodos de Contagem de esporos e microrganismos

#### 3.2.1. Contagens de esporos

A contagem do número total de esporos foi efetuada utilizando um hemocitómetro (Anexo A2). Foram realizadas contagens da suspensão-mãe não diluída e de uma diluição a  $10^{-1}$  da suspensão-mãe. Efetuaram-se os cálculos tendo em conta o volume de suspensão na câmara de contagem de 0,1mm<sup>3</sup>.

### **3.2.2. Contagem de microrganismos mesófilos totais e contagem de bactérias lácticas**

A determinação do número total de microrganismos mesófilos e número de bactérias lácticas viáveis em termos de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) foi realizada por inoculação à superfície com vareta dobrada em L. Efetuaram-se diluições seriadas em água estéril e inoculou-se de 0,1mL das suspensões diluídas em placas de meio rico YPD (contagem de mesófilos totais) e placas de meio MRS (contagem de bactérias lácticas). Incubaram-se as placas a 28 e 37°C respetivamente. Após incubação, selecionaram-se as placas correspondentes às diluições que continham aproximadamente entre 30 e 300 colónias, procedeu-se à contagem das colónias nestas assumindo que cada UFC teve origem numa célula

## **3.3. Preparação do inóculo para produção de tempeh**

### **3.3.1. Preparação da “cultura-mãe”**

A preparação do pré-inóculo foi inicialmente efetuada utilizando meio sólido MEA e meio sólido PDA. A partir de uma placa de YPD com *R. oligosporus*, preparou-se uma suspensão de hifas e esporos frescos de forma a ter uma concentração inicial de esporos de  $10^6$ /mL. Estes meios foram colocados em placas de 14cm de diâmetro com 100mL de meio de cultura e em balões de Erlenmeyer de 250mL com 50mL de meio (rolha de algodão) e inoculados a partir de uma suspensão de hifas e esporos frescos de *R. oligosporus*. Os meios inoculados foram incubados a 28°C em meio PDA e 37°C em meio MEA durante 5 dias. Depois do período de incubação observou-se o crescimento diferencial de esporos. Com esse crescimento obtivemos assim a cultura-mãe. A cultura-mãe é definida como sendo aquela a partir da qual se irá realizar novas culturas do fungo *Rhizopus oligosporus*.

### **3.3.2. Preparação e manutenção do inóculo**

O procedimento foi, semelhante ao descrito por Ruiz-Terán e Owens (1996), em que primeiro se reproduz o inóculo e depois este é suspenso de modo a proceder às contagens e, posteriormente, à inoculação de farinha.

### ***3.3.2.1. Preparação da suspensão de esporos***

De modo a usar-se um inóculo fresco, prepararam-se “culturas-mãe” frescas a partir de culturas anteriores. Para tal ressuspendeu-se o fungo em água destilada estéril a fim de obter uma suspensão com um conteúdo de  $10^6$  esporos/mL (Ruiz-Terán e Owens 1996).

Iniciou-se a preparação do inóculo com a recolha deste a partir de meio sólido MEA. Com o auxílio de uma ansa e uma espátula estéreis, raspou-se a superfície a fim de se retirar os esporos e hifas. O micélio foi cortado de modo a facilitar a libertação dos esporos e ressuspendido em água desmineralizada estéril, 20ml de água para o caso do conteúdo das placas de 100mL e 15mL para o conteúdo do erlenmeyer. Agitou-se no vortex durante 1' e procedeu-se à contagem do número de esporos em cada suspensão.

### ***3.3.2.2. Preparação do inóculo***

Neste trabalho, a matéria-prima não foi inoculada diretamente com o fungo mas sim com farinha esterilizada e posteriormente inoculada com o fungo.

A partir da suspensão-mãe de esporos preparada em 3.3.2.1 e tendo em conta os resultados das contagens do número total de esporos, procedeu-se à diluição da suspensão de modo a garantir uma suspensão com aproximadamente  $10^6$  esporos/mL. Depois de estéril e seca, a farinha foi inoculada com o fungo, 20ml de suspensão preparada por cada 100g de farinha de maneira a obtermos aproximadamente  $10^6$  esporos/grama. A suspensão foi colocada à superfície da farinha, sem agitação, tapou-se e incubou-se durante 5 dias a 28°C.

Após este período de incubação, procedeu-se a uma etapa de secagem da farinha durante 24 horas a 60°C numa estufa de secagem com circulação de ar.

### ***3.3.2.3. Conservação do inóculo***

Após secagem o inóculo (farinha+fungo) foi subdividido em sacos selados e conservado por congelação a -70°C até ser necessário. Desta forma, foi possível evitar o crescimento adicional do fungo e manter constante a quantidade de esporos existentes na farinha.

## **3.4. Preparação da Matéria-prima para elaboração do tempeh**

A escolha da matéria-prima é um passo crucial para a elaboração de qualquer tipo de tempeh. Para este trabalho foram selecionados varias leguminosas e um cereal.

### **3.4.1. Substratos utilizados**

Neste trabalho foram usados diferentes produtos dos quais nove foram leguminosas e um cereal. As leguminosas usadas foram o feijão de soja, o feijão mungo, as lentilhas, feijão branco, feijão encarnado, feijão-frade, feijão preto, grão e o tremço. O cereal utilizado foi a cevada.

### **3.4.2. Preparação da matéria-prima**

Para qualquer destas matérias-primas, o procedimento base foi semelhante, incluindo um passo de demolha e um passo de cozedura. Numa fase inicial, testou-se também o efeito da adição de ácido láctico durante o processo de demolha.

#### ***3.4.2.1. Demolha***

Depois de efetuada a escolha e remoção dos grãos danificados, os grãos foram demolhados. Este processo consistiu em colocar os feijões em água à temperatura ambiente por um período de tempo previamente determinado durante o qual ocorre a hidratação do grão e eventual fermentação láctica.

Relativamente às matérias-primas feijão de Soja, encarnado, preto, branco, frade, grão e tremço (matérias primas menos perecíveis) colocaram-se 500g de grão (aproximadamente 400mL) em copos de dois litros e prefez-se o volume de 2L com água desmineralizada esterilizada. No caso das leguminosas mais perecíveis e de menor volume de grão (lentilhas e feijão mungo) e da cevada, colocaram-se 40mL de grão em copos de 250mL e prefez-se o volume até 200mL com água desmineralizada esterilizada. Em ambos os casos, o tempo de demolha efetuado foi de 24 horas (exceção feita aos ensaios preliminares abaixo descritos).

#### ***Ensaio preliminares para a determinação do tempo de demolha***

Com vista à determinação do tempo de demolha ideal e ao efeito desta sobre a fermentação láctica ocorrida durante a demolha, efetuaram-se ensaios preliminares com soja, feijão-mungo, lentilhas e cevada nas condições descritas acima, em que se recolheram dados de pH da água de demolha utilizando um eléctrodo de pH (Radiometer), e se recolheram amostras para determinação do número de microrganismos aeróbios totais e de bactérias lácticas procedendo de acordo com o descrito em 3.2.2.

Foram recolhidas amostras ao fim de 0, 6, 12 e 24 horas.

### Ensaio preliminares para a determinação do efeito da adição de ácido láctico

Com vista à determinação do efeito da adição de ácido láctico à água de demolha, realizaram-se ensaios em paralelo nos quais se adicionou ácido láctico à água de forma a obter uma concentração final de 0,11M (Ruiz-Terán e Owens, 1996). Recolheram-se amostras para contagem do número de microrganismos mesófilos totais e bactérias láctica (pelo método descrito em 3.2.2) para determinação do pH da água de demolha ao fim de 0, 6, 12 e 24 horas de demolha. Estes ensaios foram realizados apenas com o feijão de soja, lentilhas, feijão mungo e cevada.

#### **3.4.2.2. Cozedura**

Após a demolha, procedeu-se à etapa de cozedura dos grãos com o objetivo de cozer o grão e facilitar o acesso futuro do fungo aos substratos, bem como facilitar a hidratação e remoção da casca.

Todas as matérias-primas foram cozidas em água, separadamente, sem adição de qualquer condimento e sem pressão.

A cozedura foi feita de modo a que os feijões ficassem cozidos, mas não em demasia. Deixou-se cozer os feijões (feijão de Soja, e as Lentilhas, feijão branco, feijão encarnado, feijão-frade, feijão preto, grão) durante cerca de 90 - 110 minutos. O feijão Mungo, a cevada e a lentilha tiveram um tempo de cozedura de 50-60 minutos.

#### **3.4.2.3. Remoção da casca e condições de armazenamento da matéria-prima**

Após a cozedura, deixou-se arrefecer os grãos até atingirem uma temperatura próxima da temperatura ambiente e removeram-se manualmente as cascas das leguminosas de maior dimensão. No caso dos grãos de menor dimensão a casca não foi removida.

Os grãos descascados foram depois escorridos e secos, após o que foram armazenados no frigorífico até à sua utilização. Nos casos em que foi necessário um período de armazenamento mais alargado optou-se por congelar a matéria-prima até serem utilizadas.

## 3.5. Preparação e conservação de Tempeh

### 3.5.1. Inoculação e incubação

Depois de cozer, escorrer e secar o substrato, procedeu-se à inoculação das várias matérias-primas com uma porção de farinha previamente inoculada com esporos de *Rhizopus oligosporus*.

Anteriormente à inoculação procedeu-se à homogeneização da farinha inoculada com o auxílio de um copo liquidificador estéril, de modo a tornar uniforme a distribuição do fungo pela farinha e eliminar os grãos maiores.

Efetuuou-se o cálculo da quantidade de farinha a ser utilizada em cada substrato e usou-se a discrição (-) e (+) para definirmos as quantidades de inóculo a serem usadas, sendo (-) para a quantidade calculada de esporos,  $10^6$  esporos e (+) para o dobro dessa quantidade. Sendo assim usamos 5g e 10g de inóculo para 100g de feijão. O inóculo foi pesado com uma balança digital portátil e foi inoculado na matéria-prima de forma a garantir uma distribuição homogênea da farinha inoculada nos grãos. Depois de inoculados os substratos, colocou-se em pequenos sacos de plástico, moldou-se e selou-se, e efetuaram-se furos, de modo regular, com intervalos de 0,5 cm, nos sacos a fim de permitir o arejamento da cultura de *R. oligosporus*.

Depois do processo de embalagem incubaram-se os sacos, tendo-se testado duas temperaturas de incubação, a 28°C e 37°C.

### 3.5.2. Conservação

Ao fim de 24 a 48h de incubação procedeu-se ao armazenamento do tempeh. Testaram-se duas variações de armazenamento, no frigorífico e no congelador, por tempo indeterminado ou até que sejam consumidos.

Depois de retirar o tempeh da incubadora armazenou-se no frigorífico inicialmente dentro da sua embalagem original e posteriormente colocado dentro de outra embalagem sem remover a embalagem inicial.



### **3.6. Avaliação da viabilidade do inóculo ao longo do processo de conservação**

Para testar a viabilidade do inóculo, embalou-se pequenas porções da farinha inoculada em sacos de plástico e congelou-se. Testou-se este inóculo em diversos tempos, 0 dias, 7 dias, 15 dias, 30 dias, 60 dias, 90 dias e 120 dias de armazenamento, de modo a observar se este se mantinha viável e igualmente ativo findos os tempos pré-definidos em congelação.

Com este objetivo, e nos tempos indicados, retirou-se a amostra de inóculo (farinha+esporos) inoculou-se o substrato com a farinha do mesmo lote e incubou-se nas condições descritas em 3.5 por 24 a 48 horas, observando-se o crescimento do fungo ao fim deste tempo, bem como a consistência e aspeto visual do tempeh produzido.

### **3.7. Análise sensorial**

Com esta análise sensorial pretendeu-se avaliar a seleção da matéria-prima a ser utilizada no produto, o efeito de processamento, a qualidade da textura, o sabor, a estabilidade de armazenamento e a reação do consumidor. Para alcançar o objetivo específico da análise, foram elaborados métodos de avaliação diferenciados, visando a obtenção de respostas mais adequadas ao perfil pesquisado do produto.

Foram utilizados duas metodologias de análise sensorial: a análise descritiva e a análise hedónica (Anexos A4).

#### **3.7.1. Análise descritiva**

A análise descritiva foi realizada com provadores treinados, de ambos os sexos, com idades entre os 25 e os 54 anos, num total de 10 pessoas. Os provadores eram provadores experientes, com contato com o tempeh e consequentemente com sensibilidade para perceber as diferenças entre as amostras e suas características.

Foram colocadas questões, a consumidores habituais de tempeh relativas ao produto final a provar, de modo a avaliar as características do tempeh. Os atributos avaliados foram cor, gosto e textura num teste analítico descritivo com uma escala de 1 (pouco intenso) a 6 (muito intenso), tendo sido ainda pedido que descrevessem as observações que considerassem relevantes.

As provas descritivas foram efetuadas no laboratório de Bioenergética Microbiana onde foram apresentadas a cada provador as 5 amostras em simultâneo (feijão soja, preto, vermelho, grão e tremçoço), bem como um copo de água para não haver influências de sabor.

### 3.7.2. Análise hedónica

A análise hedónica teve como alvo o público em geral, sendo o painel constituído por pessoas que não tem o hábito de consumir este produto e por pessoas que já consumiram tempeh, sendo feita por indivíduos dos 15 aos 55 anos, num total de 20 pessoas. O objetivo era a avaliação da aceitação de um novo produto, ou seja, se gostam ou não do produto. Foi colocado um questionário sobre o qual refletiram a sua escolha.

Na análise hedónica, avaliaram-se vários parâmetros, utilizando escalas de 1 (extremamente desagradável) a 8 (extremamente agradável) no aspeto geral, no aroma, gosto, textura e apreciação global e escalas de 1 (de certeza que não compraria) a 5 (de certeza que compraria) na intenção de compra. Também foi pedido que indicassem a sua preferência quanto ao tipo de tempeh/leguminosa e que indicassem sugestão de outras matérias-primas.

Data: \_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_ Profissão: \_\_\_\_\_ Idade \_\_\_\_\_

**Análise Sensorial Descritiva do Tempeh**

Avalie os seguintes parâmetros de acordo com a escala de ordem crescente

**1=Pouco 2=Ligeiro 3=Moderado 4=Forte 5=Intenso 6=Muito intenso**

**Atributo: Cor**

• Homogeneidade da Cor        
1 2 3 4 5 6

**Atributo: Gosto**

• Sabor a cogumelos        
1 2 3 4 5 6

• Sabor a nozes        
1 2 3 4 5 6

• Sabor a soja        
1 2 3 4 5 6

• Tempo que perdura na boca        
1 2 3 4 5 6

**Atributo: Textura**

• Crocante        
1 2 3 4 5 6

• Elástica        
1 2 3 4 5 6

Observações: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Figura 12 - Ficha de análise sensorial descritiva

Data: \_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_ Profissão: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_

**Análise Sensorial Hedônica do Tempeh**

Avalie os seguintes parâmetros de acordo com a escala fornecida

<p><b>Aspetto Geral</b></p> <table border="1" style="width: 100%;"> <tr><td>8 - Extremamente agradável</td></tr> <tr><td>7 - Muito agradável</td></tr> <tr><td>6 - Agradável</td></tr> <tr><td>5 - ligeiramente agradável</td></tr> <tr><td>4 - ligeiramente desagradável</td></tr> <tr><td>3 - Desagradável</td></tr> <tr><td>2 - Muito desagradável</td></tr> <tr><td>1 - Extremamente desagradável</td></tr> </table>	8 - Extremamente agradável	7 - Muito agradável	6 - Agradável	5 - ligeiramente agradável	4 - ligeiramente desagradável	3 - Desagradável	2 - Muito desagradável	1 - Extremamente desagradável	<p><b>Cheiro</b></p> <table border="1" style="width: 100%;"> <tr><td>8 - Extremamente agradável</td></tr> <tr><td>7 - Muito agradável</td></tr> <tr><td>6 - Agradável</td></tr> <tr><td>5 - ligeiramente agradável</td></tr> <tr><td>4 - ligeiramente desagradável</td></tr> <tr><td>3 - Desagradável</td></tr> <tr><td>2 - Muito desagradável</td></tr> <tr><td>1 - Extremamente desagradável</td></tr> </table>	8 - Extremamente agradável	7 - Muito agradável	6 - Agradável	5 - ligeiramente agradável	4 - ligeiramente desagradável	3 - Desagradável	2 - Muito desagradável	1 - Extremamente desagradável	<p><b>Gosto</b></p> <table border="1" style="width: 100%;"> <tr><td>8 - Extremamente agradável</td></tr> <tr><td>7 - Muito agradável</td></tr> <tr><td>6 - Agradável</td></tr> <tr><td>5 - ligeiramente agradável</td></tr> <tr><td>4 - ligeiramente desagradável</td></tr> <tr><td>3 - Desagradável</td></tr> <tr><td>2 - Muito desagradável</td></tr> <tr><td>1 - Extremamente desagradável</td></tr> </table>	8 - Extremamente agradável	7 - Muito agradável	6 - Agradável	5 - ligeiramente agradável	4 - ligeiramente desagradável	3 - Desagradável	2 - Muito desagradável	1 - Extremamente desagradável
8 - Extremamente agradável																										
7 - Muito agradável																										
6 - Agradável																										
5 - ligeiramente agradável																										
4 - ligeiramente desagradável																										
3 - Desagradável																										
2 - Muito desagradável																										
1 - Extremamente desagradável																										
8 - Extremamente agradável																										
7 - Muito agradável																										
6 - Agradável																										
5 - ligeiramente agradável																										
4 - ligeiramente desagradável																										
3 - Desagradável																										
2 - Muito desagradável																										
1 - Extremamente desagradável																										
8 - Extremamente agradável																										
7 - Muito agradável																										
6 - Agradável																										
5 - ligeiramente agradável																										
4 - ligeiramente desagradável																										
3 - Desagradável																										
2 - Muito desagradável																										
1 - Extremamente desagradável																										
<p><b>Textura</b></p> <table border="1" style="width: 100%;"> <tr><td>8 - Extremamente agradável</td></tr> <tr><td>7 - Muito agradável</td></tr> <tr><td>6 - Agradável</td></tr> <tr><td>5 - ligeiramente agradável</td></tr> <tr><td>4 - ligeiramente desagradável</td></tr> <tr><td>3 - Desagradável</td></tr> <tr><td>2 - Muito desagradável</td></tr> <tr><td>1 - Extremamente desagradável</td></tr> </table>	8 - Extremamente agradável	7 - Muito agradável	6 - Agradável	5 - ligeiramente agradável	4 - ligeiramente desagradável	3 - Desagradável	2 - Muito desagradável	1 - Extremamente desagradável	<p><b>Cor</b></p> <table border="1" style="width: 100%;"> <tr><td>5 - Muito mais escuro que o ideal</td></tr> <tr><td>4 - Mais escuro que o ideal</td></tr> <tr><td>3 - Ideal</td></tr> <tr><td>2 - Mais claro que o ideal</td></tr> <tr><td>1 - Muito mais claro que o ideal</td></tr> </table>	5 - Muito mais escuro que o ideal	4 - Mais escuro que o ideal	3 - Ideal	2 - Mais claro que o ideal	1 - Muito mais claro que o ideal	<p><b>Apreciação Global</b></p> <table border="1" style="width: 100%;"> <tr><td>8 - Extremamente agradável</td></tr> <tr><td>7 - Muito agradável</td></tr> <tr><td>6 - Agradável</td></tr> <tr><td>5 - ligeiramente agradável</td></tr> <tr><td>4 - ligeiramente desagradável</td></tr> <tr><td>3 - Desagradável</td></tr> <tr><td>2 - Muito desagradável</td></tr> <tr><td>1 - Extremamente desagradável</td></tr> </table>	8 - Extremamente agradável	7 - Muito agradável	6 - Agradável	5 - ligeiramente agradável	4 - ligeiramente desagradável	3 - Desagradável	2 - Muito desagradável	1 - Extremamente desagradável			
8 - Extremamente agradável																										
7 - Muito agradável																										
6 - Agradável																										
5 - ligeiramente agradável																										
4 - ligeiramente desagradável																										
3 - Desagradável																										
2 - Muito desagradável																										
1 - Extremamente desagradável																										
5 - Muito mais escuro que o ideal																										
4 - Mais escuro que o ideal																										
3 - Ideal																										
2 - Mais claro que o ideal																										
1 - Muito mais claro que o ideal																										
8 - Extremamente agradável																										
7 - Muito agradável																										
6 - Agradável																										
5 - ligeiramente agradável																										
4 - ligeiramente desagradável																										
3 - Desagradável																										
2 - Muito desagradável																										
1 - Extremamente desagradável																										
<p><b>Intenção de Compra</b></p> <table border="1" style="width: 100%;"> <tr><td>5 - De certeza que compraria</td></tr> <tr><td>4 - Provavelmente compraria</td></tr> <tr><td>3 - Não sei se compraria</td></tr> <tr><td>2 - Provavelmente não compraria</td></tr> <tr><td>1 - De certeza que não compraria</td></tr> </table>			5 - De certeza que compraria	4 - Provavelmente compraria	3 - Não sei se compraria	2 - Provavelmente não compraria	1 - De certeza que não compraria																			
5 - De certeza que compraria																										
4 - Provavelmente compraria																										
3 - Não sei se compraria																										
2 - Provavelmente não compraria																										
1 - De certeza que não compraria																										

Características: preferência de espessura

Mais fino: \_\_\_\_\_ Igual à amostra: \_\_\_\_\_ Mais grosso: \_\_\_\_\_

Observações: \_\_\_\_\_

Figura 13 - Ficha de análise sensorial hedônica para tempeh

### 3.8. Análise estatística

Os resultados da análise sensorial foram tratados pelos *softwares Microsoft Office Excel 2010* e *R* <http://www.R-project.org/>.

Com o programa *R*, efetuou-se uma Análise Multivariada de dados, que se refere a qualquer análise simultânea efetuada com mais do que duas variáveis, podendo estas ser dependentes ou independentes. Dentro das técnicas de análise multivariada efetuou-se uma Análise em Componentes Principais e uma Análise de Clusters que foram aplicados aos resultados de cada amostra, tanto nas fichas sensoriais descritivas como nas hedônicas.

#### 3.8.1 Análise em Componentes Principais

Qualquer matriz de duas categorias podem ser apresentados como um biplot que consiste de um vetor para cada fila e um vetor para cada coluna, escolhido de modo a que todo o elemento de matriz é exatamente o produto interno dos vetores correspondentes à linha e à sua coluna. O biplot proporciona uma ferramenta útil para a análise de dados e permite a avaliação visual da estrutura de grandes matrizes de dados (Gabriel, 1971).

A análise de componentes principais é uma técnica da estatística multivariada que consiste em transformar um conjunto de variáveis originais em outro conjunto de variáveis de mesma dimensão denominadas de componentes principais. A análise de componentes principais é associada à ideia de redução de massa de dados, com menor perda possível da informação (Varella, 2008) (Anexo A4).

### **3.8.2Análise de Clusters**

Um cluster é uma coleção de objetos de dados que são semelhantes entre si dentro do mesmo grupo e são diferentes para os objetos em outros clusters. O processo de agrupar um conjunto de objetos físicos ou abstratos em classes de objetos similares é chamado de clustering. Clustering é o processo de agrupar um conjunto de objetos de dados em vários grupos ou clusters de modo que os objetos dentro de um cluster têm grande similaridade, mas são muito diferentes de objetos em outros clusters (Han et al, 2012) (Anexo A4).

## 4. Resultados e Discussão

A fermentação de matérias-primas de origem vegetal como leguminosas e cereais cumpre dois objetivos essenciais, por um lado permite a sua melhor conservação aumentando o tempo de vida destes grãos quando demolhados, e por outro lado permite obter novos produtos com propriedades nutricionais e organoléticas distintas das características das matérias-primas originais e com um valor nutricional e comercial superior ao destas.

O tempeh, um dos principais produtos fermentados à base de leguminosas, produzido nos países orientais, é a designação geral dada ao bolo compacto obtido por fermentação de grãos de leguminosas (e em alguns casos cereais) pré-cozinhados, aos quais é dada uma consistência de massa compacta pelo crescimento do micélio de um fungo filamentoso (normalmente *Rhizopus oligosporus*).

Atualmente o tempeh é particularmente procurado pela sua natureza vegetal e pelas vantagens em termos nutricionais e de saúde, dado que é um produto altamente nutritivo, de fácil digestão e com propriedades organoléticas similares às da carne sobretudo quando cozinhado, sendo considerado um bom substituto desta última e um ótimo complemento proteico de uma alimentação rica em matérias-primas amiláceas como o arroz ou o trigo. Dadas estas características, a procura de tempeh nos países ocidentais tem vindo a crescer e a par desta a procura de novas formas de tempeh produzido a partir de matérias-primas mais diversificadas.

No entanto, a maioria do tempeh é produzido ainda em regime tradicional à escala doméstica, em condições de inóculo e fermentação não padronizadas, o que não permite a colocação no mercado de um produto homogéneo, consistente e padronizado que cumpra as exigências de qualidade e segurança do consumidor ocidental.

Para além disso, o tempeh é um produto com um tempo de conservação limitado, acastanhando e amolecendo com relativa facilidade devido à atividade enzimática e à senescência do micélio, podendo mesmo originar-se odores desagradáveis a amoníaco.

Atendendo a estes fatores, aliados à ausência em Portugal de uma entidade que forneça inóculos seguros e padronizados bem como estabeleça processos padrão de produção que permitam obter um produto de qualidade, procurou-se desenvolver um trabalho experimental em duas vertentes: 1) desenvolvimento de metodologias de produção e conservação de inóculos seguros para a produção de tempeh que possam ser fornecidos à indústria alimentar e à restauração e 2) desenvolvimentos de métodos padrão de produção e conservação de tempeh. A par disto, procurou-se também diversificar o tipo de

matérias-primas usado, no sentido de contribuir para a maior aceitação e variedade deste produto no mercado.

#### 4.1. Desenvolvimento de metodologias para produção de inóculos seguros e padronizados para a produção de tempeh

Com o objetivo de produzir inóculos seguros, com um comportamento padronizado e simples de utilizar na produção de tempeh em pequena escala e por parte da indústria alimentar, procurou-se numa primeira etapa estabelecer as condições necessárias para cultivar e manter *Rhizopus oligosporus*, bem como desenvolver um método que permitisse uma eficaz inoculação dos grãos e armazenamento do inóculo em condições que preservassem a sua viabilidade.

##### 4.1.1. Estabelecimento das condições ótimas para esporulação de *Rhizopus oligosporus*

Em primeiro lugar, procurou-se determinar qual o melhor meio de cultura para obter um crescimento e esporulação abundantes de *R. oligosporus*. Para tal, utilizaram-se dois meios distintos PDA (Potato Dextrose Agar) e MEA (Malt Extract Agar) que foram inoculados com  $10^6$  esporos de *R. oligosporus* a partir de uma suspensão de micélio e esporos com  $10^7$  esporos/mL, obtida por ressuspensão do conteúdo de uma placa de YPD onde o fungo havia sido refrescado, tendo o número total de esporos sido determinado por contagem em hemocitômetro (Anexo A2). As placas foram incubadas a 28°C durante 5 dias.

O desenvolvimento do fungo foi visível após 3 dias de incubação, sendo o micélio mais abundante no caso do meio PDA. Em contrapartida, no meio MEA ao fim do mesmo tempo já era possível observar esporulação, visível na forma de uma zona mais escura no centro da placa (Figura 14). Esta observação foi confirmada por observação direta da placa ao microscópio, sendo possível observar um muito maior número de esporângios no micélio de *R. oligosporus* cultivado em meio MEA que em meio PDA.

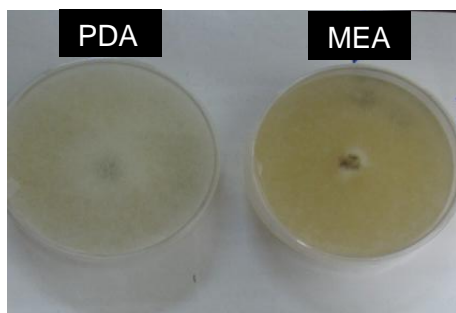


Figura 14 - Crescimento de fungo em meio PDA e meio MEA ao fim de 3 dias de incubação.

Ao fim de cinco dias o desenvolvimento do micélio por toda a placa foi claramente observável para ambos os meios (Figura 21), continuando a observar-se micélio mais abundante em meio PDA que em meio MEA, mas mais esporos neste último.

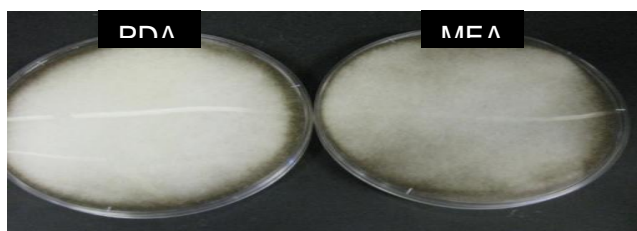


Figura 15 - Aspeto dos fungos após 5 dias de incubação

Este resultado vem ao encontro de resultados descritos por alguns autores (Ruiz-Terán e Owens, 1996; Thanh e Nout, 2003) que referem que o meio PDA permite frequentemente um crescimento abundante do micélio, em virtude de ser um meio mais rico, levando ao crescimento do micélio em detrimento da esporulação. Por outro lado, o meio MEA sendo um meio menos rico favorece a esporulação (Figura 15).

Tendo conta que o objetivo era obter o maior número de esporos possível de *R. oligosporus* com vista a preparar o inóculo necessário à produção de tempeh, optou-se por continuar o trabalho cultivando o fungo em meio MEA.

#### 4.1.2. Otimização do método de inoculação de *Rhizopus oligosporus*

Após a otimização das condições de crescimento de *R. oligosporus* a etapa seguinte foi otimizar a preparação do inóculo, de maneira a que este fosse apresentado ao potencial consumidor/produtor de tempeh de uma forma que fosse segura em termos microbiológicos, com um número de esporos viáveis controlado, e que em simultâneo fosse fácil de inocular de nos grãos da leguminosa, permitindo uma distribuição homogênea dos esporos para que o processo fermentativo decorresse eficazmente e de forma controlada.

Para tal, e tendo em conta processos já descritos na literatura [(Kuswanto, 2005; Feng et al, 2005; Thanh e Nout, 2003)] optou-se por utilizar um suporte sólido em pó, neste caso por farinha de trigo, dado esta ser uma matéria-prima composta por um pó fino, comestível, barata, fácil acesso, e passível de ser esterilizada por autoclavagem, podendo ser utilizada no tempeh sem que confira alterações significativas no gosto do produto final.

O método desenvolvido para a produção do inóculo para tempeh consistiu na inoculação de farinha, previamente esterilizada por autoclavagem, com 20mL de uma suspensão de esporos preparada a partir de meio MEA inoculado com *R. oligosporus* com 5 dias de crescimento, de modo a obter  $10^6$  esporos/g de farinha.

A farinha foi mantida numa estufa de secagem a 65°C durante 24 horas para eliminar a humidade (evitando a formação de blocos) e inativar as formas vegetativas do fungo. Após a secagem/inativação triturou-se a farinha com os esporos num copo triturador, garantindo assim a obtenção de uma mistura farinha/esporos homogénea que permitisse uma distribuição homogénea dos esporos por todo o grão a quando da produção de tempeh (Figura 16).



Figura 16 - Aspeto do inóculo constituído por farinha + esporos de *R. oligosporus*.

O processo de inoculação dos grãos de leguminosa pode ser efetuado por inoculação direta dos esporos (Hutkins, 2006; Thanh e Nout, 2003) ou utilizando um suporte no qual os esporos são previamente inoculados, tal como foi escolhido neste trabalho. As grandes vantagens do segundo método em relação ao primeiro resultam de as quantidades manipuladas serem maiores, o que torna mais fácil a distribuição, manuseamento e pesagem do inóculo não exigindo equipamentos de precisão tão elevada e em simultâneo permite uma distribuição mais homogénea do inóculo evitando a existência de zonas sem esporos ou com menor número de esporos que levam à ocorrência de processos fermentativos menos eficazes resultando na existência de zonas com menor densidade micelar e menor agregação dos grãos.

#### **4.1.3. Otimização do processo de conservação do inóculo de *Rhizopus oligosporus***

Uma vez que o objetivo deste trabalho é a produção de inóculos seguros, padronizados e eficientes para a produção de tempeh que possam vir a ser usados pela restauração e público em geral (e como tal comercializados), o processo de embalagem e conservação do inóculo bem como a garantia da sua viabilidade é um aspeto fundamental, só assim, sendo possível assegurar as características originais do produto bem como a segurança do mesmo.

Numa primeira abordagem, e tendo em conta que o inóculo poderá ser vendido em lojas de produtos naturais testou-se o método de conservação mais simples que não exigisse métodos de embalagem complexos nem métodos de conservação adicionais tais



como processos de refrigeração, tendo como única preocupação a manutenção das condições de assépsia e a não contaminação da cultura de *R. oligosporus*.

Desta forma, o inóculo para produção de tempeh (farinha inoculada com esporos) foi mantido inicialmente à temperatura ambiente, numa tina e tapado com uma tampa (Figura 17), simulando condições habitualmente encontradas numa cozinha de restauração, tendo-se seguido o estado do inóculo por observação visual. A farinha foi mantida nestes moldes sendo observada ao fim de 1, 2 e 3 semanas e comparada com o aspeto de um inóculo recém-preparado (Figura 18).

Ao longo do ensaio observou-se o crescimento indesejado do micélio à superfície da farinha inoculada com os esporos de *R. oligosporus*, bem como o aparecimento de humidade resultante provavelmente do metabolismo do fungo em crescimento. O desenvolvimento observado foi mais acentuado ao fim de três semanas e foi acompanhado de esporulação significativa, levando a que o aspeto visual do inoculo se tornasse inaceitável (Figura 18).

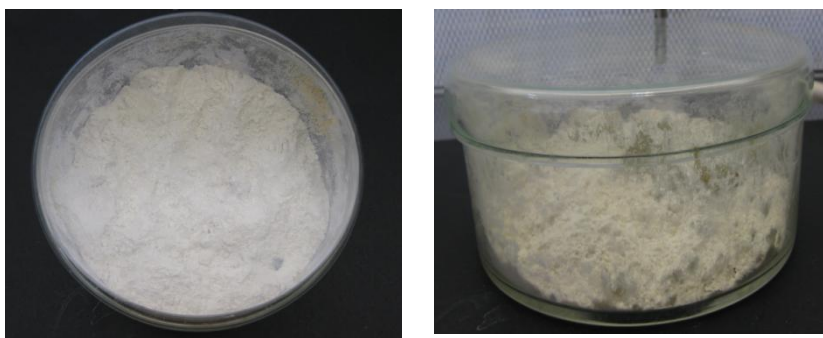


Figura 17 – Inóculo para produção de tempeh (semana 0)

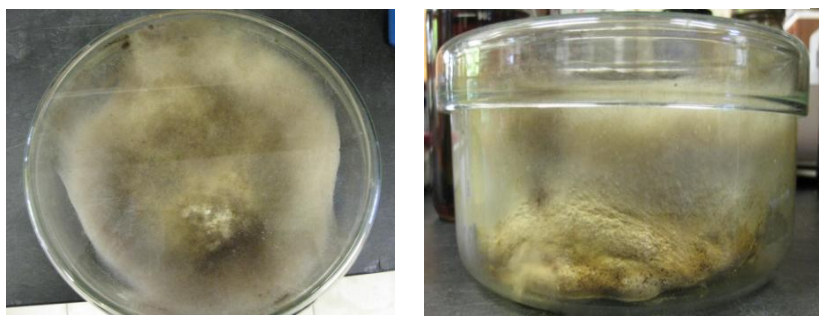


Figura 18 – inóculo para produção de tempeh conservado à temperatura ambiente (semana 3)

Uma vez que a conservação à temperatura ambiente, num meio aeróbio, não permitiu a preservação do inóculo, procedeu-se a uma segunda tentativa aplicando um processo que envolvia embalagem mas que ainda assim evitava o recurso a métodos adicionais de conservação que poderiam por em causa a viabilidade dos esporos. Assim, o inóculo foi embalado em pequenas porções de 5g de farinha+esporos em sacos

termosselados, sem espaço de cabeça e mantidos à temperatura ambiente, sendo observado semanalmente (Figura 19). Embora o crescimento do fungo na farinha inoculada e embalada, fosse menos acentuado, que o observado na Figura 18, quando o inóculo foi mantido em condições aeróbias, ao fim de 3 semanas já se observava esporulação bem como humedificação da farinha inoculada, e ao fim de quatro semanas observou-se formação de gás que inchou os sacos, levando a que o processo fosse rejeitado dado dar origem a um produto que não só viria certamente a ser rejeitado pelo consumidor como ainda tinha a agravante de o desenvolvimento de esporos levar a uma alteração do número total de esporos do inóculo e consequentemente à perda de controlo da padronização do inóculo e processo de produção do tempeh.

Por outro lado, quando se optou por manter os sacos entre 6 e 8°C (uma temperatura normal de refrigeração) muito embora se tenha aumentado o tempo de vida útil do inóculo (em termos de aspeto visual e esporulação), não foi possível inibir completamente o metabolismo do fungo, verificando-se o humedecimento da farinha e formação de gás.

Uma vez que nenhum dos processos anteriores resultou num inóculo aceitável optou-se por proceder-se ao embalamento em saco de plástico termosselado aliando a isto um processo de congelação que permitia a total inibição do crescimento e metabolismo do fungo.



**Figura 19 - Farinha inoculada embalada em saco**

O facto de se estar a aplicar um processo de congelação ao inóculo, poderia por em causa a manutenção da viabilidade dos esporos, assim como a atividade metabólica do fungo após germinação dos esporos levando igualmente a uma perda de condições padrão no número de esporos viáveis e consequentemente, também, a uma alteração no processo padrão de produção de tempeh.

Assim, com vista a verificar a influência das condições de conservação e embalamento do inóculo na viabilidade dos esporos e eficiência na produção de tempeh a partir de inóculos padrão, procedeu-se a um estudo em que se avaliou ao fim de quanto tempo o inóculo seria viável para produção de tempeh.

## **4.2. Desenvolvimento do processo de produção de tempeh de forma padronizada e consistente**

O tempeh é produzido tradicionalmente a partir de grãos de soja. O seu processo de produção envolve vários passos base, tais como Demolha, Cozimento e Descasque, Secagem, Inoculação com *R. oligosporus*, Fermentação e Embalamento/Conservação (Kuswanto, 2005; Ruiz-Terán e Owens, 1996; Hachmeister e Fung, 2003). Apesar deste conjunto de passos ser basicamente comum, existem pequenas variações em alguns deles (ver tabela 1) que permitem melhorar o processo, tornando o produto obtido mais seguro, consistente e padronizado, nomeadamente nos passos de preparação da matéria-prima (Demolha), Fermentação (Inóculo e condições de Fermentação) e Embalamento, tendo sido estas as fases que se procuraram otimizar no presente trabalho.

Com vista a estabelecer condições padrão para produção de tempeh determinou-se como formulação padrão o processo de obtenção de tempeh de soja, sendo este utilizado na otimização dos vários passos anteriormente referidos. Paralelamente, utilizaram-se outras leguminosas com características diferentes com a finalidade de verificar a aplicabilidade do processo a outras matérias-primas.

### **4.2.1. Estudo do efeito das condições de demolha no processo de produção de tempeh**

De acordo com vários investigadores (Feng et al, 2005; Hutkins, 2006; Nagai e Tamang, 2010), durante o processo de demolha ocorre uma fermentação láctica com importância crucial para a produção de tempeh. Esta fermentação conduz a uma redução do pH da água de demolha (e do grão de leguminosa), levando a que no início da fermentação fúngica o valor de pH do grão seja mais baixo (Nagai e Tamang, 2010) e consequentemente o valor de pH atingido no final dessa fermentação seja também mais baixo (Hutkins, 2006) compensando a subida de pH resultante da produção de  $\text{NH}_4$  em resultado do metabolismo de *Rhizopus oligosporus*.

Uma das variações habitualmente descritas no processo de demolha é a adição de ácido láctico ou ácido acético à água de demolha com a finalidade baixar o valor de pH inicial e de inibir o crescimento de bactérias potencialmente patogénicas.

Com vista a observar o efeito da adição de ácido láctico no pH final após a demolha bem como na ocorrência de fermentação láctica durante o processo de demolha, demolharam-se feijões de soja à temperatura ambiente na presença e na ausência de 0,5% de ácido láctico e registou-se o pH inicial e ao fim de 0, 6, 12 e 24 horas de demolha.

Simultaneamente recolheram-se amostras para avaliar o número de bactérias lácticas presentes ao fim destes tempos de demolha.

Tal como seria e esperar, o valor de pH inicial da água de demolha foi significativamente mais baixo nos casos em que se adicionou ácido láctico (Figura 20, tabela 2 e 3 Anexo A3). Verificou-se também que, ao longo do tempo de demolha, os valores de pH da água de demolha sem adição de ácido láctico foram diminuindo gradualmente, aumentando a acidez da água, muito provavelmente devido à ocorrência de uma fermentação láctica em consequência do metabolismo fermentativo das bactérias lácticas naturalmente presentes no grão sobre os açúcares que se vão libertando ao longo do processo de hidratação. Esta produção indica pois a existência de atividade microbiana nesta fase do processo.

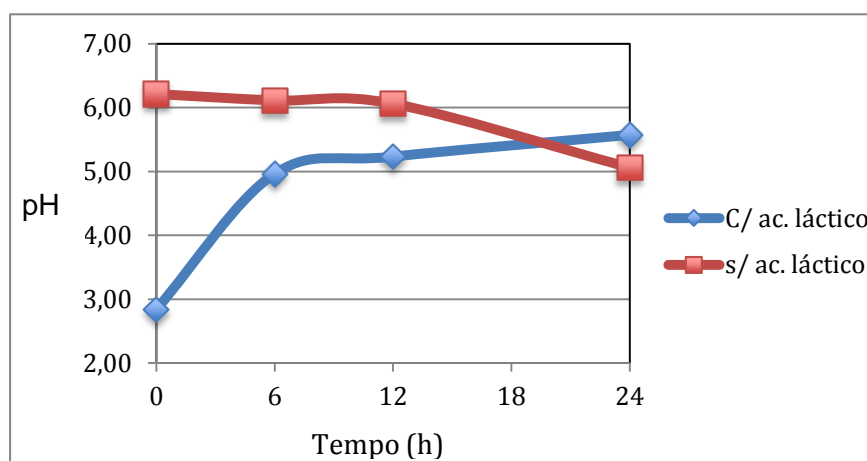


Figura 20 – Variação do pH da água de demolha de grãos de soja ao longo do tempo com e sem adição de 0,5% (p/v) de ácido láctico

No caso da adição de ácido láctico, verificou-se um aumento dos valores de pH da água de demolha, sendo este mais significativo nas primeiras 6 horas, após o que estabiliza. O aumento dos valores de pH observados no caso da adição de ácido láctico à água de demolha poderá resultar de um processo metabólico ocorrido nas primeiras 6 horas de demolha, por parte de bactérias não lácticas, que consomem o ácido láctico ou produzem metabolitos que provocam a alcalinização do meio. A ação destes microrganismos poderá não ser contrariada pela ação fermentativa das bactérias lácticas dado que estas poderão ser inibidas pelo fato de o valor de pH inicial ser próximo de 2, mais baixo do que os valores suportados pela maioria das bactérias lácticas.

Para além do feijão de soja, realizaram-se também ensaios com e sem ácido láctico utilizando outras duas leguminosas e um cereal. Os resultados obtidos permitiram verificar que, à semelhança com o observado no caso da demolha do feijão de soja, também nestes casos se observou uma diminuição dos valores de pH na água sem adição de ácido láctico, indiciando a ocorrência de uma fermentação ácida-láctica (figura 21, A, B e C)

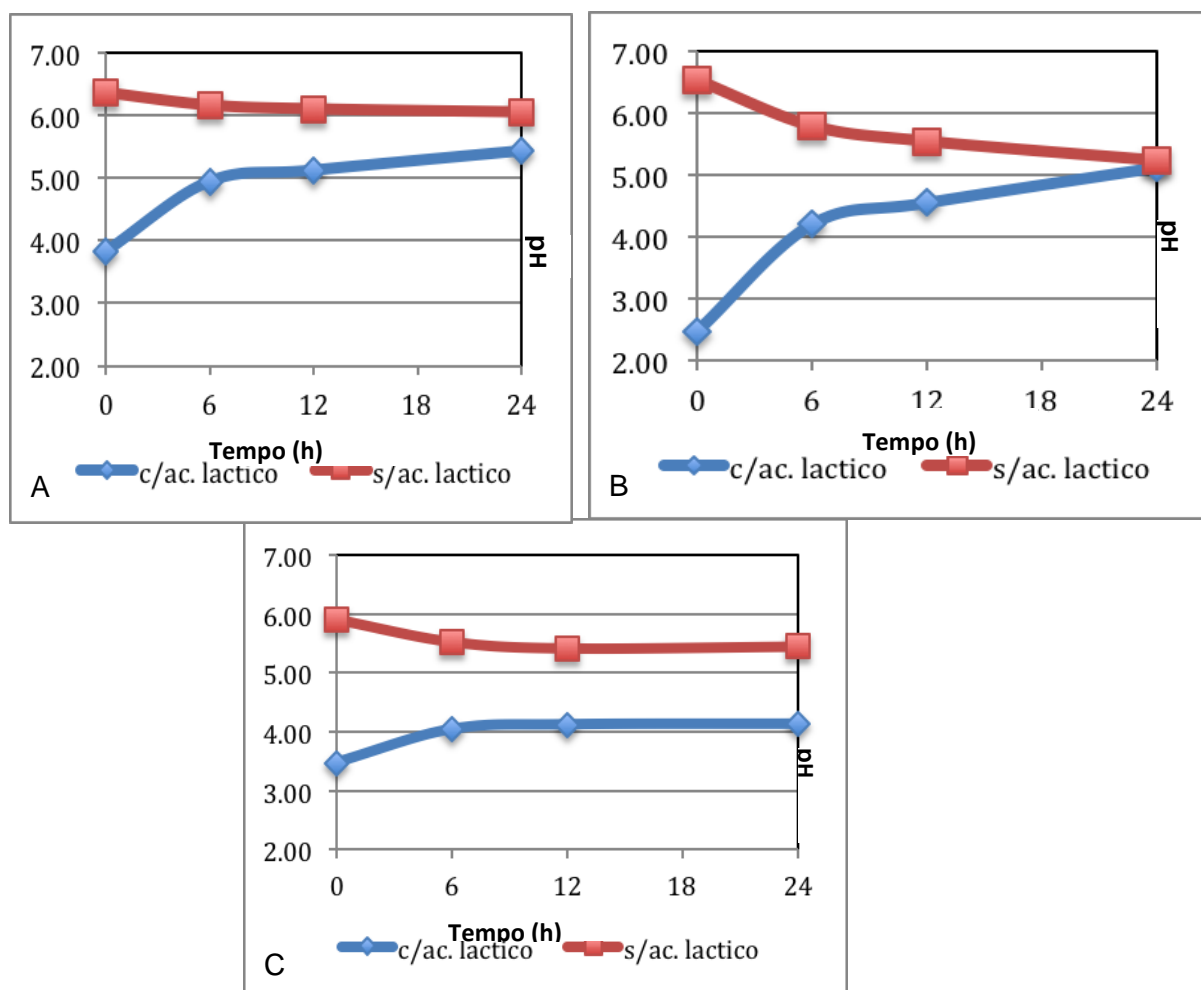


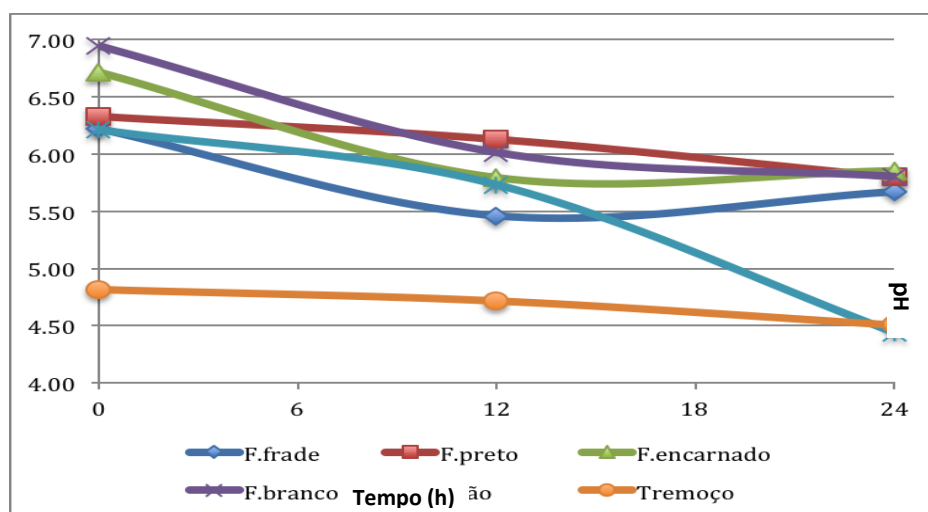
Figura 21 – Variação do pH da água de demolha de lentilhas (A), feijão mungo (B) e cevada (C) ao longo do tempo com e sem adição de 0,5% (p/v) de ácido láctico.

Atendendo aos resultados obtidos para os valores de pH da água de demolha com e sem adição de ácido láctico, verifica-se que em relação a este parâmetro, a adição de ácido láctico não traz vantagens significativas ao processo. As restantes leguminosas, não foram submetidas à adição de ácido láctico na água de demolha uma vez que, embora o pH da água em que se colocou ácido láctico seja mais baixo (como seria de se esperar), não ocorrem diferenças significativas no desenvolvimento do processo de produção. Sendo que a colocação de ácido láctico acarreta um custo mais elevado, não havendo necessidade de tal ocorrer em casa do consumidor que pretenda produzir o tempeh visto que o resultado é semelhante, ou seja, o resultado final, das amostras, não tinha diferenças expressivas.



Figura 22 – Diferenças dos substratos (sem ácido e com ácido)

Para além disso, os substratos aos quais se adicionou ácido láctico sofreram uma alteração mais significativa de cor ficando mais escuros (figura 22), e adicionalmente o processo de descasque após cozedura foi mais difícil. Assim sendo, todos os ensaios seguintes foram realizados sem adição de ácido e com 24 horas de demolha à exceção da cevada por ser uma matéria-prima mais perecível que apenas sofreu 12 horas de demolha tendo-se obtido iguais variações de pH ao longo do tempo (Figura 23).



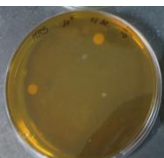
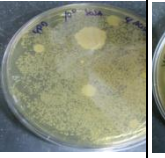
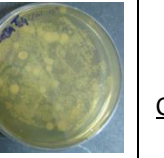
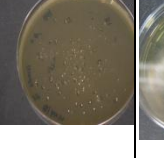
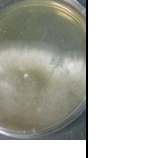

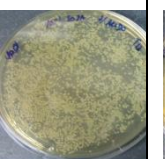

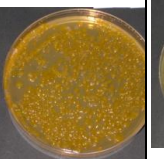
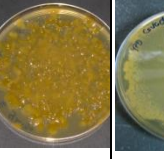

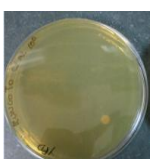


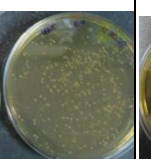
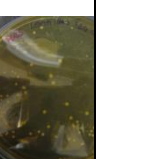

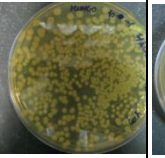
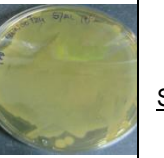
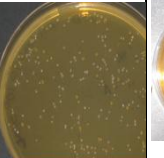
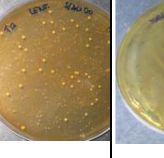

**Figura 23 – Variação do pH da água de demolha de várias matérias-primas leguminosas sem adição de ácido láctico.**

Paralelamente à determinação do pH da água de demolha, recolheram-se amostras nos mesmos tempos, com vista à avaliação da presença e número total de bactérias lácticas presentes na água de demolha com vista a verificar se existia uma correlação entre a diminuição dos valores de pH da água de demolha e a presença deste tipo de bactérias e consequentemente a ocorrência de uma fermentação ácida-láctica nesta fase.

Os resultados obtidos em meio MRS encontram-se resumidos na Tabela 2, permitindo verificar que quando se adiciona ácido láctico, o número de bactérias lácticas inicial era extremamente diminuto, o que vem ao encontro da hipótese de que a subida inicial dos valores de pH nos meios ao adicionado ácido láctico resulta em parte da ausência de uma fermentação ácida-láctica inicial. De acordo com as observações das placas t0 (placa com zero horas de demolha), o crescimento de bactérias lácticas na água de demolha com adição de ácido, demorou mais tempo a iniciar-se, presumivelmente porque a adição de ácido láctico inibe o desenvolvimento de microrganismos iniciais, incluindo as bactérias. Já as placas t0 em que não ocorreu adição de ácido láctico apresentaram um número elevado de colónias de bactérias, pelo que sem a inibição por parte do ácido láctico, o crescimento das bactérias foi elevado e a fermentação decorreu sem impedimentos.

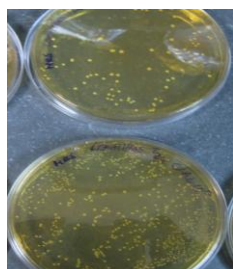


À medida que o tempo de demolha foi aumentando, aumentava também o número de colônias desenvolvidas, revelando um crescimento intenso e expressivo em ambas as experiências (tabela 2).

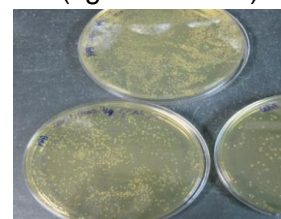
<b>Soja</b>	T0	T12	T24	<b>Cevada</b>	T0	T6	T24
<u>Com ácido</u>				<u>Com ácido</u>	Sem crescimento		
<u>Sem ácido</u>				<u>Sem ácido</u>			
<b>Mungo</b>	T0	T12	T24	<b>Lentilha</b>	T0	T12	T24
<u>Com ácido</u>				<u>Com ácido</u>	Sem crescimento		
<u>Sem ácido</u>				<u>Sem ácido</u>			

**Tabela 2 - comparação do desenvolvimento colônias de bactérias**

Tendo em conta que as bactérias lácticas crescem normalmente em meio MRS, optou-se por experimentar, observar o crescimento em meio rico YPD, os resultados revelaram um crescimento ligeiramente mais acentuado no meio YPD (figura 24 e 25).



**Figura 24 - demolha de lentilhas com ácido láctico em meio MRS**



**Figura 25 - demolha de lentilhas com ácido láctico em meio YPD**

<sup>1</sup> Placa contaminada com fungo

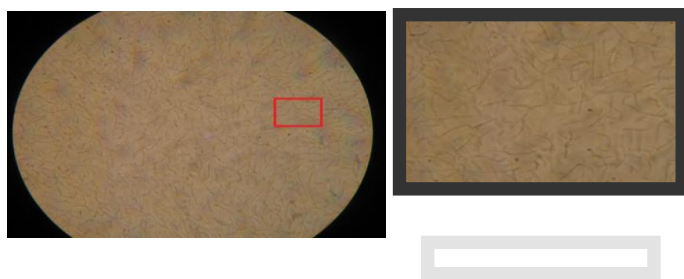


Figura 26 - observação microscópica de bactérias lácticas

#### 4.2.2. Estudo da influência das condições de fermentação no processo de produção de tempeh

O tempeh é caracterizado por ser um bolo compacto, de película branca formado pelo micélio do fungo *Rhizopus oligosporus*, constituído por feijão soja hidratado e cozido.

Após estabelecidas as condições de demolha procedeu-se à otimização das condições de fermentação.

Uma vez que um dos objetivos do trabalho era diversificar os tipos de tempeh estes ensaios foram realizados com várias leguminosas e um cereal.

O uso de diferentes grãos na produção de tempeh, teve como princípio o de se testar o desenvolvimento do *Rhizopus oligosporus* em diferentes matérias-primas obtendo diferentes sabores. Testou-se também, nesta fase, duas variações de temperatura de incubação a fim de se verificar qual a mais eficaz para o crescimento do fungo no tempeh.

##### 4.2.2.1. Otimização da quantidade de inóculo

A quantidade de inóculo a ser utilizado no fabrico de tempeh é um passo muito importante, uma vez que dele depende se a matéria-prima leva inóculo suficiente para cobrir a matéria-prima e dar consistência ao bolo num período de tempo suficientemente curto para que não ocorra desenvolvimento de microrganismos de alteração nem processos de alteração que ponham em causa não só a segurança do produto como a sua textura. Para tal, atendendo aos dados da literatura (Ruiz-Terán e Owens, 1996, Rodriguez *et al*, 2003) definiu-se a quantidade de farinha padrão inoculada (5g) a ser utilizada em cada 100g de substrato e usamos a discrição (-) e (+) para definirmos as quantidades de inóculo a serem usadas, sendo (-) para a quantidade calculada de esporos,  $10^6$  esporos e (+) para o dobro dessa quantidade.

Os resultados obtidos permitiram verificar que para ambas as concentrações de inóculo o produto obtido apresentava um micélio uniforme com uma consistência compacta e sem indícios visíveis de deterioração ao fim de 48 horas, pelo que, não havendo



vantagens em termos de processo, em usar uma maior concentração de esporos, se optou por prosseguir o trabalho utilizando 5g de inóculo por 100g de feijão.

#### **4.2.2.2. Otimização das condições de empacotamento dos grãos**

O embalamento dos grãos foi feito num saco de plástico, fechado e depois perfurado. Os furos foram feitos de forma homogênea e regular em toda a extensão do saco fim de permitir que o fungo respire e cresça, uma vez que *Rhizopus oligosporus* cresce preferencialmente em presença de oxigénio. As perfurações permitem ainda libertar o dióxido de carbono e parte do vapor de água produzidos durante a fermentação contribuindo para obter um produto de aspeto seco. Depois de embalado e perfurado, o saco com o conteúdo foi comprimido levemente de forma a dar uma estrutura compacta, sem espaços livres para que possa haver um crescimento homogêneo do fungo. A não compactação da matéria-prima leva a que o micélio não cresça só a superfície, como se pretende mas sim à volta dos grãos, deixando os grãos soltos e com distribuição disforme da película branca do micélio fazendo com que sequem mais rapidamente.

Inicialmente foram testados sacos perfurados com um espaço entre cada furo de 1cm. No entanto, verificou-se que nestas condições o crescimento do fungo era na maioria dos casos muito deficiente. Optou-se então por fazer furos com espaçamento de 0,5cm, o que permite um maior número de furos e consequentemente um arejamento mais eficaz bem como a libertação de dióxido de carbono potencialmente tóxico para o fungo (Lacasse, 1999).

Com este processo foi possível obter um crescimento micelar abundante e homogeneamente distribuído, resultando num bolo com consistência firme.

Atendendo a estes resultados os procedimentos seguintes foram efetuados com sacos perfurados com furos espaçados de 0,5cm.

#### **4.2.2.3. Incubação dos grãos**

Relativamente ao processo de fermentação dos grãos, testaram-se as várias matérias prima selecionadas com a mesma concentração de inóculo (5g), incubando a duas temperatura de incubação, sendo uma das temperaturas mais alta (37°C) (Hutkins, 2006; Feng et al, 2005; Kuswanto, 2006), próxima da temperatura ótima de muitos microrganismos potencialmente patogénicos, e uma mais próxima da temperatura ambiente 28°C (Aworth e Egoulety, 2001; Ruiz-Terán e Owen, 1996; Thanh e Nout, 2003) e por isso mais fácil de conseguir sem recurso a estufas de incubação. Estas duas temperaturas foram escolhidas por serem ambas temperaturas habitualmente utilizadas na produção de tempeh (Thanh e Nout, 2003).



**Figura 27 - Resultado final da fermentação – tempeh – para vários tipos de leguminosas**

Incubaram-se os grãos inoculados e empacotados a estas temperaturas (28 e 37°C) pelo período de fermentação que havia sido selecionado anteriormente (48 horas). Após as 48 horas observou-se o aspeto (cor, crescimento do fungo, cheiro) e a consistência do bolo obtido para as várias leguminosas. Quando a temperatura de incubação foi a 37°C só no caso do feijão vermelho, tremoço e grão, o tempeh produzido foi considerado aceitável com base nas características sensoriais que apresentava, observando-se crescimento micelar abundante, cor branca, aspeto homogêneo e textura consistente. No caso das restantes matérias-primas (soja, feijão preto e feijão frade), a observação do crescimento de *R. oligosporus* durante as 48 horas de incubação a 37°C, permitiu verificar que o fungo crescia muito lentamente, de forma heterogênea, não produzindo um bolo compacto.

O prolongamento do tempo de incubação a esta temperatura não resultou na melhoria do processo obtendo-se ou um tempeh seco, pouco compacto, com grãos soltos, ou um tempeh extremamente mole e com sinais visíveis de putrefação quer em termos de consistência quer de cheiro (Figura 28). Em ambos os casos os bolos foram rejeitados.



**Figura 28 - Exemplos de tempeh rejeitado**

Por outro lado, quando se incubou a 28°C e se observou o crescimento ao longo das 48 horas de incubação, verificou-se que o micélio crescia de forma significativa quer à superfície quer em torno dos grãos. A esta temperatura de incubação, ao fim de 24 horas, o crescimento micelar cobria por inteiro os grãos de forma homogênea em todas as formulações com as diferentes matérias-primas, formando um bolo de aspeto agradável muito embora a consistência ainda não fosse tão forte como o pretendido. Em virtude disso, optou-se por deixar o bolo por mais 24 horas (48 horas de incubação no total) de modo a consolidar a textura. Este tempo de incubação permitiu obter um bolo altamente consistente,

com um crescimento homogêneo do micélio e sem que ocorresse ainda esporulação obtendo-se o aspeto agradável esperado (Figura 29).

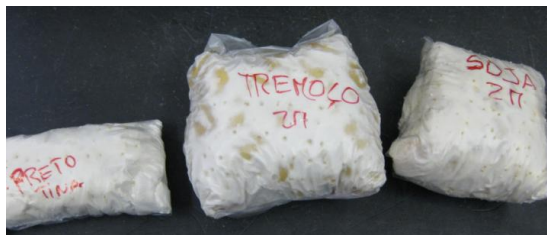


Figura 29 - Exemplos de tempeh com 48 horas de incubação a 28°C

Uma vez que a 28°C, para todas as matérias-primas usadas, se obtiveram bons resultados ao fim das 48 horas de incubação, optou-se por usar sempre esta temperatura e tempo, 28°C/ 48h, durante o resto dos ensaios.

#### 4.2.3. Otimização das condições de embalagem e conservação do Tempeh

Após produzir os tempehs de acordo com as condições descritas em 4.2.2. foi necessário otimizar o processo de embalagem e armazenamento de forma a poder garantir que o tempeh produzido em condições padrão ótimas se mantinha com as mesmas qualidades organoléticas por um período de tempo significativo. Com esta finalidade testaram-se duas condições de embalagem (sem revestimento plástico exterior ao saco e embalado a vácuo com um revestimento plástico exterior ao saco), e duas condições de conservação (no frigorífico e no congelador) por tempo indeterminado.

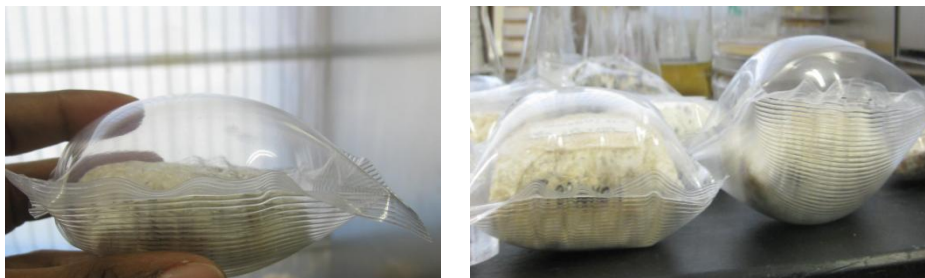
A hipótese de conservação à temperatura ambiente foi descartada à partida uma vez que a esta temperatura ocorria crescimento do fungo e posteriormente esporulação o que leva a que o bolo escureça ficando com um aspeto visual desagradável. Da mesma maneira, uma vez que as duas hipóteses de armazenamento do tempeh implicavam ambas aplicação de frio e ausência de exposição à luz, optou-se por utilizar sempre embalagens de polipropileno transparentes, dado neste caso não se prever a ocorrência de exposição à luz.

Quando se armazenou diretamente o tempeh no frigorífico dentro da sua embalagem original, verificou-se que ao fim de uma semana os diferentes tempeh começavam a ficar secos e escureciam bastante, deixando-os com um aspeto pouco agradável. Esta alteração de aspeto devia-se à produção de esporos que não era suficientemente inibida mesmo a baixas temperaturas (Figura 30).



Figura 30 - Tempeh armazenado no frigorífico ao fim de 1 semana

Numa tentativa de otimizar o processo de conservação no frigorífico, procedeu-se a um novo ensaio em que se colocou o tempeh produzido num novo saco de polipropileno sem retirar da embalagem original e embalou-se o tempeh a vácuo selando a embalagem externa por termosoldadura, de forma a impedir a entrada de ar e inibir o contínuo crescimento do fungo. Armazenou-se no frigorífico e observou-se periodicamente.



**Figura 31 - Tempeh embalado a vácuo e armazenado no frigorífico**

Ao fim 48h após o armazenamento nestas condições observou-se que as embalagens se apresentavam inchadas (Figura 31), pelo que, mesmo em refrigeração (4-8°C), o fungo continuou o seu metabolismo, produzindo uma elevada quantidade de gás que provocou o inchamento dos sacos exteriores. Este inchamento não foi observado na ausência de saco exterior uma vez que os sacos em que estava o tempeh estão abundantemente perfurados. Desta forma, conclui-se que o embalamento num saco sob-vácuo seguido de refrigeração não é um processo eficaz para conservar o tempeh mesmo por períodos de tempo relativamente curtos.

Dado que o processo de armazenamento em ambiente refrigerado não permitiu a conservação das propriedades do tempeh, testou-se o armazenamento do tempeh por congelação, a -70°C, depois de embalado a vácuo em embalagens termoseladas. Verificou-se que esta forma de armazenamento é bastante eficaz uma vez que cessa o crescimento de qualquer microrganismo. Este armazenamento faz com que o tempeh continue com propriedades organoléticas similares às obtidas logo após a incubação, um bolo compacto com uma película branca à volta (Figura 32).



**Figura 32 - Aspeto tempeh congelado**

#### 4.2.4. Resumo das condições otimizadas para a produção de tempeh

Tendo em conta os resultados obtidos nos pontos anteriores, as condições de demolha, quantidade de inóculo, tempo e temperatura de fermentação e condições de embalagem e conservação do fungo selecionadas foram:

- Demolha – demolha sem adição de ácido láctico durante 24 horas
- Quantidade de inóculo –  $10^6$  esporos/g de grão de leguminosa, ou seja, 5g de inóculo/100g de grão
- Temperatura de incubação – 28°C
- Tempo de incubação – 48 horas
- Embalamento – embalamento em embalagem exterior de polipropileno transparente termoselada a vácuo
- Conservação – conservação por congelação

Foram estas condições otimizadas que se usaram posteriormente para a produção de tempeh em larga escala (para os testes de análise sensorial) para os ensaios sobre a manutenção da viabilidade de *R. oligosporus* no inóculo.

#### 4.3. Estudo da influência do tempo de armazenamento do inóculo na produção de tempeh

Com o objetivo de observar o comportamento do inóculo em termos de viabilidade e capacidade fermentativa quando sujeito às condições de armazenamento, comparou-se a produção de tempeh com inóculos frescos e com o tempeh produzido a partir inóculo congelado por períodos de tempo pré-determinados. Para tal, preparou-se inóculo (farinha+esporos) em larga escala, separou-se em sacos de 5g de fungo inoculado em farinha, selou-se e guardou-se a -70°C. Aos 0 dias, 15 dias, 30 dias, 60 dias e 3 meses de armazenamento, retiraram-se do congelador os sacos com inóculo e preparou-se tempeh a partir de feijão de soja, preto, encarnado, de tremço e grão, e de acordo com as condições otimizadas descritas em 4.2.4., observando o crescimento do micélio nos grãos.

O teste de viabilidade, aos zero dias de armazenamento, ou seja, tempeh produzido com inóculo fresco sem armazenamento, mostrou um crescimento viável do micélio à superfície da matéria-prima ao fim de 48h de incubação a 28°C. Este primeiro teste revelou que o inóculo estava funcional e produzia tempeh com as características desejadas.

Ao fim de 15 dias de armazenamento do inóculo testou-se a viabilidade deste. O ensaio revelou que o fungo continuava a crescer de forma homogênea em alguns. No teste de viabilidade, após 30, 60, 90 e 120 dias de armazenamento do inóculo, embalado em pequenos sacos e colocados no congelador, verificou-se que a fermentação pelo fungo decorreu como o esperado, com formação do micélio em toda a superfície do grão. Ao fim de 24h já era visível a formação de tempeh e findo as 48h o resultado estava consolidado. Com este efeito foi possível confirmar a manutenção da viabilidade do fungo inoculado quando congelado.

## 4.4. Análise estatística

### 4.4.1. Análise em Componentes Principais

De acordo com a análise estatística, feita com recurso à Análise em Componentes Principais, dos dados das provas realizadas ao público geral, podemos verificar que 98,7% da variabilidade total dos dados, obtidos nesta análise, é preservada pela projeção da nuvem de pontos sobre o subespaço bidimensional que é gerado pelas duas componentes principais, ou seja, a análise em que se obteve duas dimensões explicam 98,7% da variabilidade total dos resultados da opinião dos consumidores.

	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5
<b>Standard deviation</b>	1,908	1,1396	0,23692	0,07287	2,05E-17
<b>Proportion of Variance</b>	0,728	0,2597	0,01123	0,00106	0,00E+00
<b>Cumulative Proportion</b>	0,728	0,9877	0,99894	1	1,00E+00

Tabela 3 - Importância dos componentes

A observação da variância de cada variável (Tabela 4), mostra que as variáveis “Aspetto geral”, “Gosto” e “Apreciação geral” têm uma maior variabilidade relativamente às restantes variáveis. Segundo o método de Análise em Componentes Principais, as variáveis nestas condições são muito associadas à primeira componente principal.

	Aspetto.geral	Cheiro	Gosto	Textura	Apreciação.geral
<b>Aspetto.geral</b>	1	0,27814762	0,95904265	0,7575058	0,9950458
<b>Cheiro</b>	0,2781476	1	0,04267146	-0,3590435	0,3321961
<b>Gosto</b>	0,9590427	0,04267146	1	0,9033223	0,9278234
<b>Textura</b>	0,7575058	-0,35904352	0,90332227	1	0,7000296
<b>Apreciação.geral</b>	0,9950458	0,33219614	0,92782338	0,7000296	1

Tabela 4 - Análise de variâncias das variáveis

A confirmação deste facto foi observada através da análise de correlação entre a primeira componente principal e cada uma das variáveis (Tabela 5). Nota-se que existe uma correlação elevada entre a primeira componente principal e as variáveis “Aspetto geral”, “Gosto” e “Apreciação geral”.

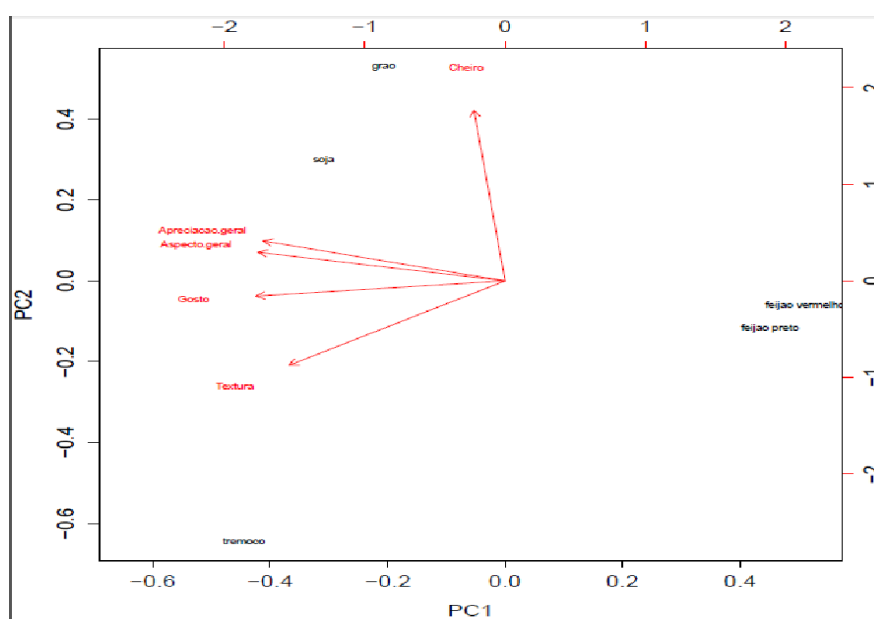
	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5
<b>Aspetto.geral</b>	-0,984123	0,1657913	0,06333311	-0,00187495	-0,48347735
<b>Cheiro</b>	-0,123941	0,98567044	-0,1140803	0,008831216	-0,52108734
<b>Gosto</b>	-0,992892	-0,08772009	-0,0575917	-0,056161029	-0,26777832
<b>Textura</b>	-0,860895	-0,48864324	-0,1363581	0,038648325	0,08304862
<b>Apreciacao.geral</b>	-0,963825	0,23079148	0,13112748	0,024112563	-0,55609549

**Tabela 5 - Análise da correlação entre as componentes principais e as variáveis**

É possível verificar, também, a existência de uma correlação elevada entre a primeira componente principal e a variável “Textura”, isto deve-se ao fato desta variável estar fortemente correlacionada com as variáveis “Aspetto”, “Gosto” e “Apreciação geral”. Esta ocorrência pode ser verificada na matriz de correlação entre variáveis originais (Tabela 4).

Observando a tabela 5, é possível observar a forte relação entre a segunda componente principal e a variável “Cheiro”. Esta variável à qual as outras se relacionam negativamente tem influência na definição da segunda maior direção da variabilidade dos dados, ou seja, tem uma grande probabilidade de estar associada à segunda componente principal.

Através da análise do gráfico biplot (figura 33) é possível visualizar as conclusões anteriores relativamente a estes resultados.



**Figura 33 - Biplot das amostras e das variáveis**

Na observação deste gráfico é possível reparar na elevada correlação entre as variáveis “Apreciação geral” e “Aspetto geral” que é visível no fato dos vetores associados aos respetivos marcadores apontarem quase no mesmo sentido e de existir um ângulo menor entre os vetores dos marcadores, o mesmo se verifica com o marcador da variável “Gosto”. O fato destes vetores estarem quase na horizontal reflete-se na elevada correlação destas variáveis com a primeira componente principal (horizontal).

A elevada correlação da segunda componente com a variável “Cheiro” reflete-se no marcador desta variável estar quase na vertical. Mostra também que existe uma menor correlação entre esta variável e as restantes uma vez que o ângulo entre os seus vetores é maior.

Por fim podemos afirmar que o recurso à Análise em Componentes Principais aplicou-se a este conjunto de dados por ser uma das técnicas que melhor permite a redução da dimensionalidade dos dados para duas dimensões (neste caso), sendo que esta redução foi feita com sucesso pois permitiu preservar 98,7% dos dados obtidos.

Esta análise bidimensional permitiu a separação espacial destas amostras de acordo com as preferências dos consumidores. É possível verificar a divisão das amostras em subgrupos de acordo com as suas preferências, agrupando os tempehs de soja, tremço, grão dentro da categoria de melhor classificação, sendo que os tempehs de feijão vermelho e feijão preto foram agrupados dentro da categoria de pior classificação. Assim, os consumidores tiveram uma maior preferência pelos tempehs de soja, tremço e de grão, com uma maior escolha pelo tempeh de tremço.

#### **4.4.2. Análise de Clusters**

A Análise de *Clusters* pretende agrupar os dados em conjuntos de forma a construir grupos em que:

- Os seus elementos sejam o mais parecido entre si
- Os grupos sejam o mais diferente entre si

A Análise de *Clusters* permite criar um centróide de cada grupo com a caracterização do elemento médio desses grupos. Isto permite saber se as escolhas dos provadores experientes são semelhantes ou diferentes.

Os dados fornecidos pela análise sensorial realizada aos consumidores com conhecimentos de tempeh foram analisados utilizando o programa R. A técnica de análise de *clusters* permitiu inferir sobre as escolhas dos consumidores no que diz respeito aos tempehs de acordo com os diferentes atributos. Neste caso, foram questionados 10

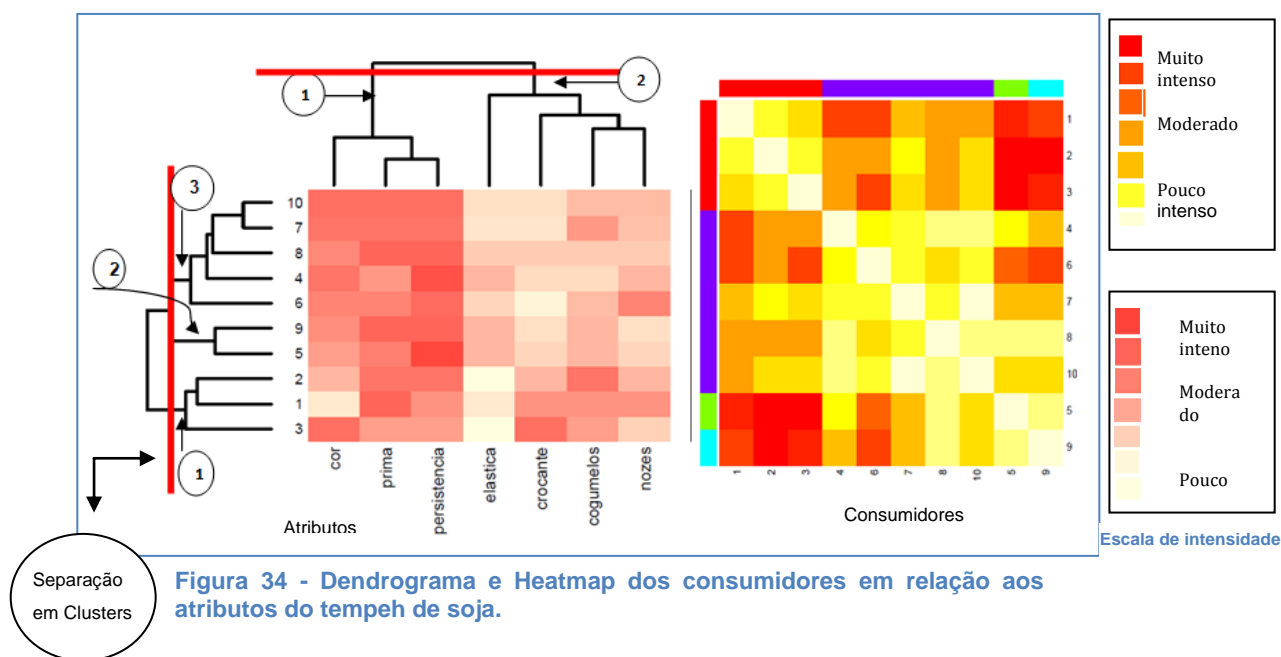


consumidores aos quais foram dados 5 tempes e submetidos a classificação consoante 5 atributos.

Os resultados foram apresentados num dendrograma hierárquico, em que quanto mais afastadas forem as linhas maior é a diferença entre as variáveis, e num *heatmap* em que a intensidade das cores aumenta de acordo com o aumento das pontuações atribuídas ou seja, as cores mais escuras revelam os atributos que obtiveram pontuações mais elevadas e as cores mais claras revelam os atributos que obtiveram pontuações mais baixas.

A Análise dos resultados foi feita para cada matéria-prima individualmente.

De acordo com a análise de *clusters* feito em relação ao tempheh de soja e observando o dendrograma (figura 34), a partida podemos logo destacar, que em relação, somente, aos atributos, é possível separá-los claramente em dois *clusters*, o primeiro que engloba a “Homogeneidade da cor”, Sabor à “Matéria-prima” (soja) e “Persistência do sabor”, que obtiveram as classificações mais elevadas ou seja, na sua opinião estes atributos eram mais intensos. No segundo *cluster* ficaram os atributos com menor intensidade na classificação, na escala apresentada, a “Textura crocante” e “elástica”, o “sabor a cogumelos” e “nozes”.



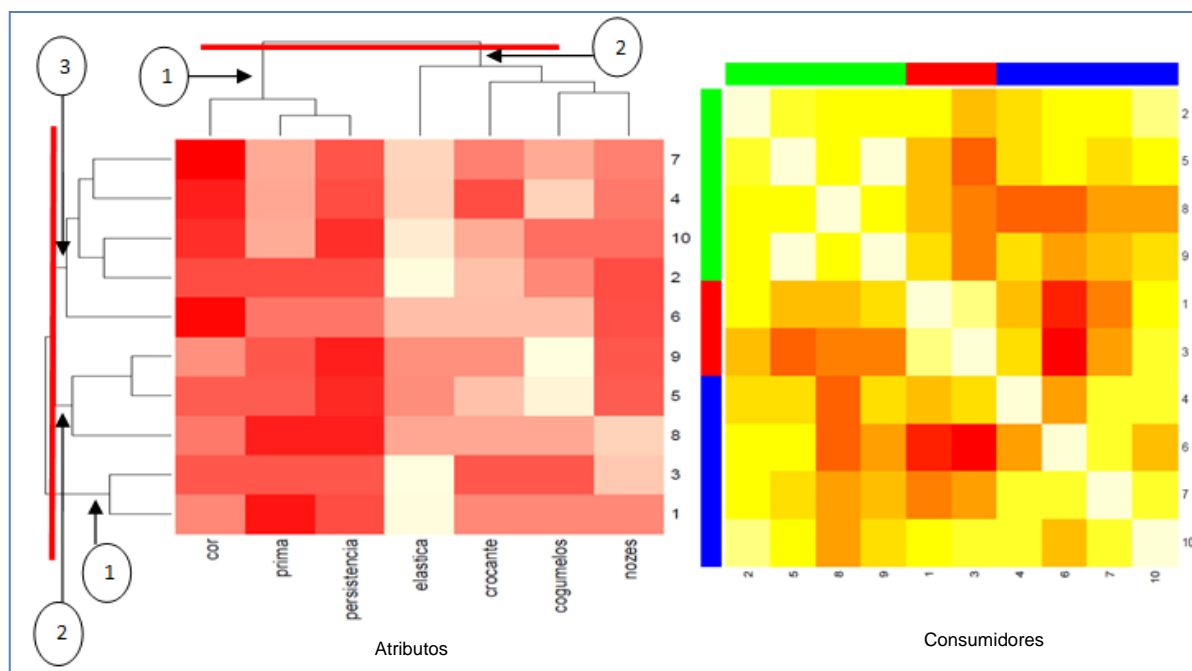
Quanto à classificação do tempheh de soja dada pelos consumidores (figura 34) de acordo com os atributos, dividimos o dendrograma em três *clusters* agrupando os indivíduos com classificações semelhantes ou seja, indivíduos mais próximos entre si. No primeiro *cluster* ficaram agrupados os indivíduos 1, 2, 3 que classificaram o tempheh como tendo uma moderada homogeneidade da cor, intenso sabor a soja e muito persistente na boca, tem

uma textura crocante e com pouco sabor a nozes e cogumelos. No segundo *cluster* ficaram os indivíduos 9 e 5 com classificação semelhante, de que o tempeh de soja tem uma cor homogênea, textura mais elástica com moderado sabor a cogumelos. No terceiro *cluster* os indivíduos 10, 7, 8, 4, 6 que avaliaram esta amostra como tendo uma elevada homogeneidade da cor, com sabor a soja muito intenso e bastante persistente na boca, definiram a textura como não sendo nem crocante nem elástica.

Na figura 34 pode-se observar o agrupamento dos indivíduos de acordo com a intensidade dada na classificação dos atributos.

Quanto à soja, podemos afirmar, de acordo com a classificação dos consumidores, que o tempeh de soja tinha um sabor a soja e persistência na boca era intenso e a homogeneidade da cor era elevada.

Em relação aos resultados do tempeh de tremoço (Figura 35), embora não tão perceptível como na figura 34 é possível observar a separação dos atributos em 2 *clusters* de acordo com a classificação dada pelo consumidor. Sendo que no primeiro *cluster* e com, grande nível de semelhanças estão os atributos de “sabor a tremoço”, “persistência na boca” e a “homogeneidade da cor” sendo estes os atributos mais intensos. O segundo *cluster* engloba os restantes atributos, “textura elástica, crocante”, “sabor a cogumelos” e “sabor a nozes”.



**Figura 35 - Dendrograma e heatmap dos consumidores em relação aos atributos do tempeh de tremoço.**

Em concordância com os resultados apresentados na figura 35, podemos aglomerar os consumidores em três *clusters*, de acordo com a proximidade entre eles de acordo com

as suas escolhas. Dentro de cada grupo estão os consumidores que mais se assemelham entre si de acordo com as classificações atribuídas a cada parâmetro. *Clusters* diferentes correspondem a avaliações diferentes. No primeiro *cluster* reúne-se os indivíduos 1 e 3, que classificaram este tempeh como moderado relativamente aos atributos “sabor a tremço”, “homogeneidade da cor” e “persistência na boca”. No segundo *cluster* agrupa-se os indivíduos 8, 5 e 9 que consideram que o tempeh de tremço tem uma intensa persistência na boca, mas um sabor a tremço e nozes moderado, e por fim no terceiro *cluster* ficam os consumidores 6, 2, 10, 4 e 7 que classificaram o este alimento como tendo uma elevada homogeneidade da cor, moderado sabor a tremço mas muito persistente na boca, textura crocante e intenso sabor a nozes.

Para os inquiridos, de um modo geral, o tempeh de tremço tem uma intensa persistência na boca, moderado sabor a tremço bem como a nozes.

Quanto ao tempeh de grão, ao observarmos a análise feita aos seus atributos foi, e á semelhanças das outras análises, possível separar os resultados em dois *clusters* (figura 36). O primeiro inclui os atributos de “Homogeneidade da cor”, “Sabor a grão” e Persistência na boca” “que são os que revelam a classificação de maior intensidade-

No lado oposto encontra-se o subgrupo dos atributos “textura crocante e elástica”, “Sabor a cogumelos e nozes”.

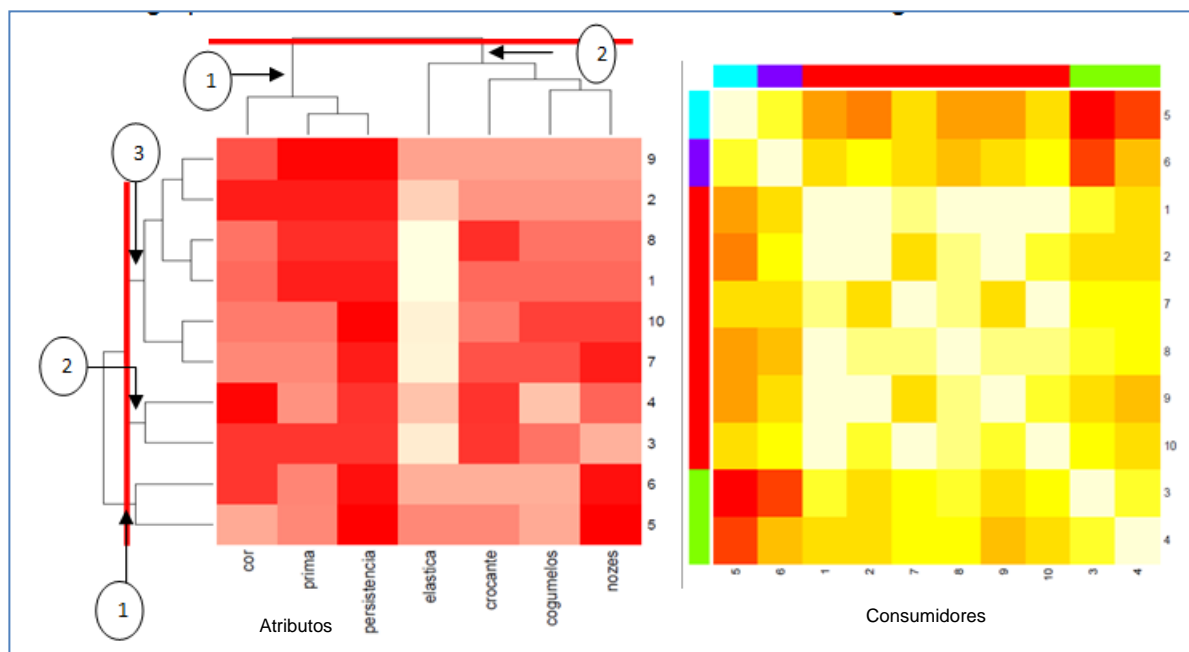
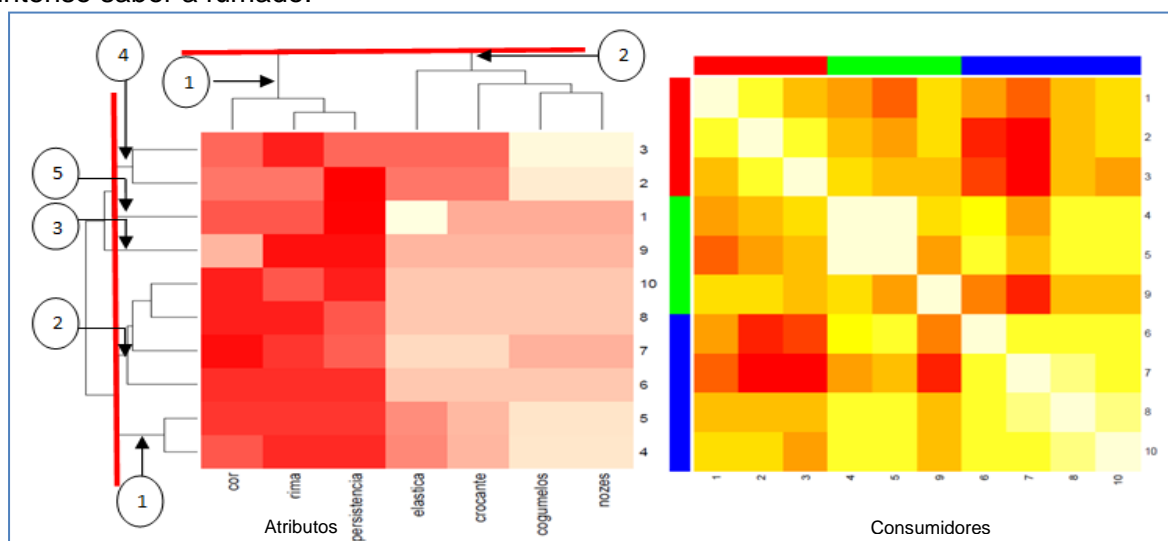


Figura 36 - Dendrograma e heatmap dos consumidores em relação aos atributos do tempeh de grão.

Ao agruparmos os consumidores de acordo com as semelhanças das suas classificações dos atributos do tempeh de grão (figura 36), obtemos três *clusters*. No

primeiro *cluster* encontram reunidos os provadores 5 e 6, que caracterizaram o tempeh de grão como tendo uma homogeneidade da cor moderado, com textura elástica, sabor a nozes e muito persistente na boca. No segundo *cluster*, agruparam-se os consumidores 3 e 4 que classificaram a amostra como tendo uma cor homogênea, um sabor intenso a grão e pouco intenso a nozes e cogumelos, mas bastante persistente na boca e muito crocante. No terceiro *cluster* ficaram agrupados os consumidores 10 e 7, 1, 8, 2 e 9. Este grupo caracterizou esta amostra como tendo um sabor a grão muito intenso e persistente na boca, cor pouco homogênea e com uma fraca textura elástica ou crocante.

Da análise sensorial realizada para o feijão preto, os resultados permitiram dividir os consumidores em cinco *clusters* (Figura 37) (grupos que se assemelham entre si), os resultados foram muito diferentes e isso implica um maior número de clusters. No primeiro grupo ficaram os consumidores 4 e 5 que caracterizaram o tempeh de feijão preto como tendo uma cor muito homogênea, intenso sabor a feijão preto e muito persistente na boca e com fraco sabor a cogumelos e uma textura elástica. No segundo grupo colocou-se os inquiridos 6, 7, 8, 10, que qualificaram esta amostra segundo a sua cor homogênea, forte sabor a feijão preto e moderado sabor a cogumelos e nozes. No terceiro *cluster* foi colocado o consumidor 9 que caracterizou a amostra pela sua fraca homogeneização de cor, com um sabor a feijão preto muito intenso e pela sua forte persistência na boca. No quarto grupo ficaram os inquiridos 2 e 3 que notaram uma moderada homogeneidade da cor, intenso sabor a feijão preto e muito persistente na boca, tinha uma textura crocante-elástica. No último *cluster* colocou-se o consumidor 1 que caracterizou o tempeh de feijão preto como de acordo com a sua elevada persistência na boca, intenso sabor a feijão preto e moderado sabor a cogumelos e nozes. Este consumidor também caracterizou esta amostra como sendo muito crocante. Esta amostra também foi definida como muito ácida e com um intenso sabor a fumado.

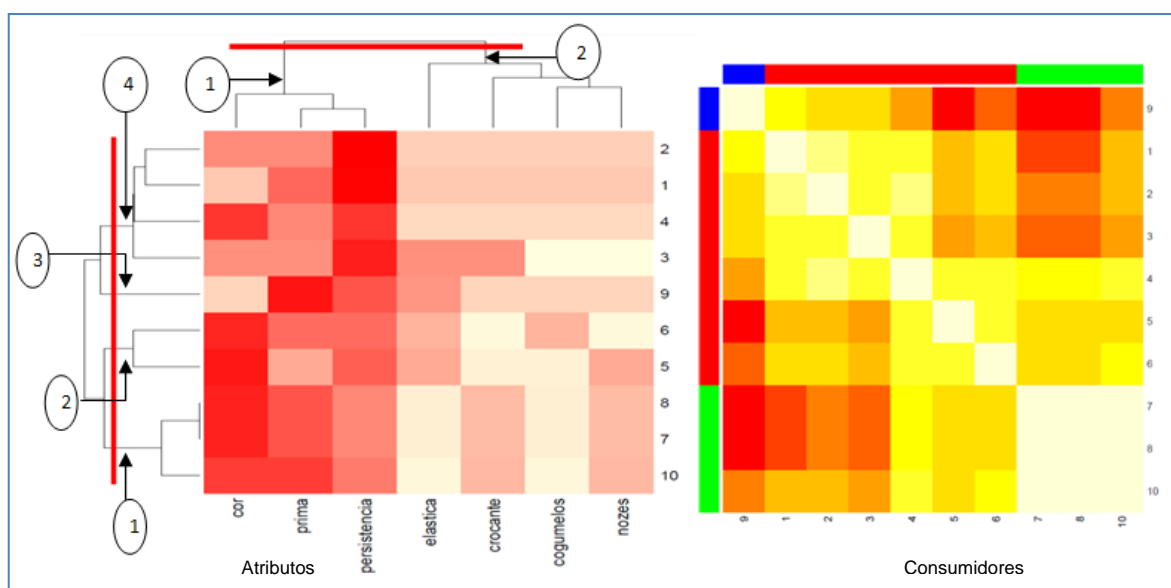


**Figura 37 - Dendrograma e heatmap dos consumidores em relação aos atributos do tempeh de feijão preto.**

Em relação ao tempeh de feijão vermelho, agrupando os consumidores de acordo com intensidade das suas escolhas, podemos obter três *clusters* representados na figura 38 pelas cores azul, verde e vermelho.

Em relação à opinião dos consumidores em relação ao tempeh de feijão vermelho foi possível dividi-los em três *clusters* de acordo com as parecidozas entre elas. Na figura 38 podemos observar o dendrograma e o *heatmap* dos resultados da prova de tempeh de feijão vermelho. A análise de *clusters* permitiu dividir os consumidores e agrupá-los, de acordo com a proximidade dos seus resultados, em quatro *clusters*. No primeiro encontra-se os consumidores 10, 7 e 8 que avaliaram a amostra quanto à sua elevada homogeneidade, ao intenso sabor a feijão vermelho e persistência na boca. Amostra tinha uma textura crocante e intenso sabor a nozes.

No segundo *cluster*, agruparam-se os consumidores 5 e 6, considerando que a amostra tinha uma cor homogênea, moderado sabor a feijão preto mas persistente na boca, e com um moderado sabor a nozes e cogumelos.



**Figura 38 - Dendrograma e heatmap dos consumidores em relação aos atributos do tempeh de feijão vermelho.**

No grupo três ficou o consumidor 9 que considerou que a amostra tinha uma fraca homogeneidade da cor, intenso sabor a feijão vermelho e moderado sabor a cogumelos e nozes mas persistente na boca. Por fim, no quarto *cluster* encontram-se os consumidores 3, 4, 2, 1, que classificaram a amostra pelo seu sabor moderado a feijão vermelho e muito persistente na boca, textura um pouco crocante e sabor pouco intenso a cogumelos e

nozes. Estes provadores ainda afirmaram que este alimento se destacava pela acidez e intenso sabor a fumado.

Podemos concluir que os provadores avaliaram a intensidade dos diferentes tempehs de acordo com os atributos apresentados. A análise de *clusters* serviu para agrupar os provadores em grupos de acordo com as semelhanças apresentadas, ou seja os resultados são muito próximos, permitindo assim comprimir os dados. De um modo geral, os consumidores tiveram uma maior preferência pelos tempehs de soja e tremço, sendo este ultimo o que reuniu uma maior preferência por parte dos inquiridos.

## 5. Considerações finais e perspectivas futuras

O tempeh é um alimento fermentado, originário da indonésia e a sua produção foi partilhada por toda a ilha devida à simples tecnologia envolvida e os enormes benefícios nutricionais que advêm deste alimento.

A produção de tempeh envolve duas fermentações, a primeira fermentação ocorre durante o processo de demolha, é bacteriana e resulta numa acidificação do pH do grão que previne o aparecimento microrganismos tais como o *Bacillus cereus*. A segunda fermentação resulta do crescimento do micélio do *Rhizopus oligosporus* nos grãos.

A produção de tempeh, para além do uso de diferentes grãos, pressupõe a fermentação em estado sólido, destes mesmos grãos por um fungo, *Rhizopus oligosporus*, através do desenvolvimento do micélio por toda a superfície da matéria-prima. Este fungo é inoculado primeiro em farinha, para preparação do inóculo, e posteriormente na matéria-prima.

Para a produção deste alimento, é necessário garantir a segurança de todas os produtos envolvidos desde a matéria-prima, o inóculo, até ao produto final.

De acordo com Egounlety e Aworh (2003), as práticas caseiras de demolha, descasque e cozedura efetivamente melhoram o valor nutricional de legumes. Bem como o aquecimento húmido destrói o inibidor da tripsina. A fermentação também tem sido reportada como um importante fator para melhorar os valores sensoriais e nutricionais de leguminosas.

A produção de um inóculo seguro pressupõe o conhecimento de algumas características do microrganismo a ser utilizado, bem como o seu funcionamento.

Um dos métodos de replicação de esporos reside na ressuspensão dos esporos e posteriormente inoculá-lo em placas para o seu crescimento. A confirmação da viabilidade do inóculo é feita através da inoculação do fungo em farinha e de seguida inocular os grãos para a produção de tempeh.

O objetivo deste trabalho visava o desenvolvimento de um inóculo seguro e eficiente para a produção de tempeh em pequena escala. Para tal realizou-se testes de viabilidade do inóculo e determinados tempos de armazenamento do inóculo e testou-se na produção de tempeh.

Com estes resultados concluímos que a viabilidade do inóculo pode ser observada através do crescimento do fungo à superfície dos feijões, e a sua eficácia determinada pela forma como o micélio cobre os grãos. Completamos então que um inóculo, farinha com

fungo, é viável até 4 meses depois da sua produção, e armazenados no congelador. Ou seja, verificou-se que se o inóculo for armazenado no congelador, é possível apurar que o fungo se mantém funcional até 4 meses após o início do seu armazenamento.

Quanto aos grãos, podemos concluir que a produção de tempeh, inicialmente feito a partir de feijões soja, também resulta com a utilização de outros feijões, tais como o feijão preto, grão e feijão vermelho, bem como resulta igualmente com o tremoço. O fungo desenvolve-se eficientemente, sendo que o tempeh está pronto quando uma película branca cobrir por completo a matéria-prima formando um bolo compacto. Este processo demora cerca de 48h a 28°C numa estufa. Durante esta fermentação o micélio penetra várias camadas de células no cotilédone da soja.

O fabrico do tempeh, com qualquer um dos grãos pode ser produzida em casa utilizando os procedimentos referidos e a incubação terá que ser feita em ambiente quente e o posterior armazenamento em local fresco.

Concluimos também que durante o processo de demolha existe uma fermentação láctica que promove a acidez de água, produção de ácido orgânico através de bactérias, fazendo com que o pH diminua consideravelmente. As bactérias que crescem nesta fase de produção são importantes para a boa qualidade do tempeh. Esta fermentação é bastante importante uma vez que permite a eliminação de grande parte de microrganismos, alguns deles patogénicos, aumentando a segurança e aceitabilidade do tempeh.

Após realizar-se a análise sensorial com o propósito de avaliar a seleção de matéria-prima, o efeito do processamento a qualidade da textura, o sabor e a reação do consumidor, elaborou-se uma análise estatística de forma a obter respostas mais específicas.

Da análise hedónica que teve como alvo o público em geral, num total de 20 pessoas, foi realizado uma Análise em Componentes Principais que visava reduzir a dimensão da informação, em que se preservou 98,7% dos dados obtidos. Concluimos então que os atributos que mais peso tiveram na classificação dada pelos consumidores foram o “Aspeto geral”, o “Gosto” e a “Apreciação geral”. De acordo com a avaliação, os tempehs mais apreciados foram o tempeh de tremoço, tempeh de grão e o tempeh de soja. Tendo obtido uma boa avaliação quanto ao sabor destes alimentos. O tempeh que obteve maior preferência foi o de tremoço. A intenção de compra variou entre o “provavelmente compraria” e o “de certeza compraria”.

Os tempehs de feijão preto e feijão vermelho foram os que obtiveram uma avaliação mais baixa e os atributos que influenciaram essa decisão foram o sabor ácido, sabor pouco intenso a feijão e a textura elástica, mais mole. A intenção de compra variou entre o “Não sei se compraria” e o “de certeza que não compraria”.



Da análise descritiva realizada a 10 consumidores conhecedores do tempeh, em que se pretendia que avaliassem as diferenças entre as amostras e as suas características bem como a sua preferência, elaborou-se uma análise estatística recorrendo à Análise de Clusters. Desta análise, que pretende reunir dados que são semelhantes entre si dentro do mesmo grupo e separar os dados que são diferentes, concluímos que as avaliações dadas por estes consumidores foram variadas de acordo com a matéria-prima. Para todas as matérias-primas os atributos que tiveram maior classificação, de acordo com a intensidade, foram “Homogeneidade da cor”, Sabor à “Matéria-prima” e “Persistência do sabor” tendo sido estes atributos que mais contribuíram para a escolha das suas preferências.

Quanto à soja, podemos afirmar, de acordo com a classificação dos consumidores, que o tempeh de soja tinha um sabor muito intenso a soja e de elevada persistência na boca, quanto à homogeneidade da cor, esta era elevada.

Para os inquiridos, o tempeh de tremço tem uma intensa persistência na boca, moderado sabor a tremço, bem como sabor intenso a nozes.

O tempeh de grão apresentava uma moderada homogeneidade da cor, com sabor intenso a grão e muito persistente na boca. Quanto à textura esta crocante-elástica e com sabor intenso a nozes.

Os tempehs de feijão preto e feijão vermelho revelaram, de acordo com a opinião dos consumidores, como sendo duas amostras com uma moderada homogeneidade da cor da amostra, com sabor a matéria-prima muito intenso mas também sabor intenso a nozes. A textura era mais elástica do que crocante.

De um modo geral o tempeh foi bem aceite pelos consumidores experientes e não experientes que revelaram apreciar os atributos deste alimento. Sendo que o sabor e o aspeto têm uma elevada importância na aceitação deste alimento.

Kuswanto (2005), finaliza afirmando que a fermentação do tempeh melhora a qualidade nutricional e as propriedades funcionais do feijão soja, a digestibilidade da proteína é melhorada, remove componentes anti nutricionais e diminui a flatulência provocada pela soja bem como de outros feijões. Melhora também a disponibilidade de minerais, aumenta o conteúdo de vitamina B, especialmente da B12 e produz substâncias antimicrobianas e antioxidantes.

De futuro, seria de grande interesse verificar a flora do tempeh depois de produzido e fermentado a fim de se verificar o se existem em microrganismos neste alimento já produzido. Posteriormente poderia vir a ser efetuado uma análise nutricional dos produtos obtidos, quer ao conteúdo proteico quer ao conteúdo em rafinose e estaquiose. A soja, matéria-prima principal na produção de tempeh, e seus derivados possuem na sua

constituição a cobalamina, no entanto, por ser um análogo inativo da vitamina B12 é inapropriado para a digestão humana. De qualquer forma, de acordo com alguns investigadores, o conteúdo em vitamina B12, no tempeh, é de grande significância. A associação de algumas bactérias, pode estar na origem deste aumento.

## Bibliografia

- BARROS, A. A., BARROS, E. B. P. (2010). *Química dos alimentos: Produtos fermentados e Corantes*, Coleção química do cotidiano, vol 4, São Paulo.
- BARROS, S. P. N. (2009). *Caracterização Química e Bioquímica da Polpa e Produtos de Nonil (Morinda citrifolia L.)*, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- BERG, S., OLSSON, J., SWANBERG, M., SCHNÜRER, J., ERIKSSON, A. (2001). *Method for the production of fermented cereal food products and products thereof*. World Intellectual Property Organization, International patent application number: PCT/SE02/00357.
- CAPLICE, E., FITZGERALD, G. F. (1999). *Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation*. International Journal of Food Microbiology, 50, 131-149.
- CORREIA, R. T. P., MCCUE, P., MAGALHÃES, M. M. A., MACÊDO, G.R., SHETTY, K. (2004). *Production of phenolic antioxidants by the solid-state bioconversion of pineapple waste mixed with soy flour using Rhizopus oligosporus*. Process Biochemistry, 39, 2167-2172.
- CUEVAS-RODRÍGUEZ, E. O., MILAN-CARRILLO, J., MORA-ESCOBEDO, R., CÁRDENAS-VALENZUELA, O.G., REYES-MORENO, C. (2003). *Quality protein maize (Zea mays L.) tempeh flour through solid state fermentation process*, Lebensm.-Wiss. u.-Technol. 37 (2004) 59–67.
- DÍAZ, B. H. C., APARICIO, A. J., PÉREZ, J. J. C., DOMÍNGUEZ, G. C., BELTRÁN, L. A., SÁNCHEZ, H. H., LÓPEZ, G. F. G. (2010). Morphological characterization of the growing front of *Rhizopus oligosporus* in solid media. Journal of Food Engineering, 101, 309–317.
- EGOUNLETY, M., AWORH, O. C. (2003). *Effect of soaking, dehulling, cooking and fermentation with Rhizopus oligosporus, on oligosaccharides, trypsin inhibitor, phytic acid and tannins of soybean (Glycine max Merr.), cowpea (vigna unguiculata L. Walp) and groundbean (Macrotyloma geocarpa Harms)*. Journal of Food Engineering, 56, 249-254.
- EKLUND-JONSSON, C., SANDBERG, A. S., ALMINGER, M. (2006). *Reduction of phytate content while preserving mineral content during whole grain cereal tempeh fermentation*. Journal of Cereal Science, in press.
- ELMONEIM, A., ELKHALIFA, O., SCHIFFLER, B., BERNHARDT, R. (2004) *Selected Physicochemical Properties of Starch Isolated from Fermented Sorghum Flour. In: STARCH - STÄRKE*. 56, p. 582 - 585

- ESTEVES, E. (2009). *Análise Sensorial – Apontamentos para as aulas teóricas da disciplina de análise sensorial do curso de Engenharia Alimentar*. Área departamental de Engenharia Alimentar, Universidade do Algarve.
- FAO Corporate Document repositior (2013). Mycotoxin prevencion and control in foodgrain- fungal damage in durable food stuuf with special reference to storage in the tropics, agriculture and consumer protection, Agriculture and consumer protection.
- FENG, X. M., ERIKSSON, A. R. B., SCHNURER, J. (2005). Growth of lactic acid bacteria and *Rhizopus oligosporus* during baley tempeh fermentation. International Journal of Food Microbiology, 104, 249-256.
- GABRIEL, K. R. (1971). *The biplot graphical display of matrices with application to principal component analysis*. Biometrika **58**, 453–467.
- GEST, H. (2004). *The discovery of microrganismos by Robert Hooke and Antoni Van Leeuwenhoek, Fellows of Royal Society*. Notes and Records of the Royal Society of London, 58, 189-201.
- GRANATO, D.; FREITAS, R. J. S.; MASSON, M. L. (2010). *Stability studies and shelf life estimation of a soy-based dessert*. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 30, p. 797-807,
- GRIFFIN, D. H. (1994). Spores dormancy and germination. In Griffin, D. H. (Ed.), Fungal Physiology. Whiley, New York, 375-398.
- HACHMEISTER, K. A., Fung, D. Y. C.,(1993). *Tempeh: A Mold-Modified Indigenous Fermented Food Made from Soybeans and/or Cereal Grains* Department of Animal Sciences and Industry, Kansas State University, Manhattan, KS, 66506 Vol. 19, No. 3, Pages 137-188
- HAN, J., KAMBER, M., PEI, J. (2012). *Cluster Analysis: Basic Concepts and Methods*. Data Mining (Third Edition), 443-495.
- HANDOYO, T., MORITA, N. (2006). *Structural and functional properties of fermented soybean (Tempeh) by using Rhizopus oligosporus*, Laboratory of Food Chemistry. Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osakci Prefecture University. Sakai, Osaka, Japan Intenationai Journal of Food Properties, 9: 347-355
- HOLZAPFEL, W. H., GEISEN, R., SCHILLINGER, U. (1995). *Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes*. International Journal of Food Microbiology, 24, 343-362.
- HUTKINS, R. W. (2006). *Microbiology and technology of fermented foods – Fermentation of Food in Orient*, 1st ed. Blackwell Publishing Lda, Iowa, 436-443.

- IFT (1981). *Sensory evaluation guide for testing food and beverage products*. Sensory Evaluation Division, Institute of Food Technologists. Food Technology, 35 (11), 50-59.
- IKASARI, L., MITCHELL, D. A. (1996). *Leaching and characterization of Rhizopus oligosporus acid protéase from solid-state fermentation*. Enzyme Microbial Technology, 19, 171-175.
- JENNESSEN, J., SCHNÜRER, J., OLSSON, J., SAMSON, R. A., DIJKSTERHUIS, J. (2008). *Morphological characteristics of sporangiospores of the tempe fungus Rhizopus oligosporus differentiate it from other taxa of the R. microsporus group*, Mycological Research, 12, 547–563.
- KAO, C. T., FRAZIER, W. C. (1966). *Effect of lactic acid bacteria on growth of Staphylococcus aureus*. Applied Microbiology, 14, 251-255.
- KATS, S. E. (2003). *Wild fermentation – The Flavor, Nutricion and craft of Live Culture Foods*, pp 65-68.
- KITPREECHAVANICH, V., MANEEBON, T., KAYANO, Y., SAKAI, K. (2008). *Comparative Characterization of L-Lactic Acid-Producing Thermotolerant Rhizopus Fungi*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 106, 541-546.
- KLAENHAMMER, T. R. (1988). *Bacteriocins of lactic acid bacteria*. Biochemie 70, 337-349.
- KUO, Y. H., BAU, H. M., QUEMENER, B., KHAN, J. K., LAMBEIN, F., (1995). *Solid-state fermentation of Lathyrus sativus seeds using Aspergillus oryzae and Rhizopus oligosporus sp T-3 to eliminate the neurotoxin  $\beta$ -ODAP without loss of nutritional value*. J Sci Food Agric 69, p 81–89
- KUSWANTO, K. R. (2005). *Industrialization of Tempe Fermentation*. in Steinkraus, K. H., *Industrialization of Indigenous Fermented Food*. 2<sup>nd</sup> edition, Revised and Expanded, New York, 587-631.
- LACASSE, D. (1999). *Os Fungos in Introdução à Microbiologia Alimentar- Ciência e Técnica*, Instituto Piaget, pp 99-125.
- LEE, C. H. (1997). *Lactic acid fermented foods and their benefits in Asia*, Food control, 8, 259-269.
- LIU, S., YE-HAN, Z. (2011). *Lactic acid bacteria in traditional fermented Chinese foods*. Food Research International, 44, 643-651.
- LYON, D. H, FRANCOMBE, M. A., HASDELL, T. A., LAWSON, K. (1982). *‘Guidelines for Sensory Analysis in Food Product Development and Quality Control’*. Chapman & Hall, London, Reino Unido.
- MAECHLER, M., ROUSSEUW, P., STRUYF, A., HUBERT, M., HORNIK, K. (2012). *Cluster: Cluster Analysis Basics and Extensions*. R package version 1.14.3.

- MAZAS, N., PÉREZ, M., (2003). *Estudio de la microbiota contaminante en el Tempeh*, Alimentaria, Revista de tecnología e higiene de los alimentos, 345, 129-132.
- MEERDINK, G. L., (2002). Mycotoxins, *Clinical Techniques in Equine Practice*, 1, 89–93.
- MIYAOKAI, M. F., (2012). *Avaliação do potencial dos Fungos do Genero Rhizopus spp na Produção de substâncias Bioativas com ação Antioxidante Utilizando diferentes Substratos*, Universidade Universal do Paraná.
- MOY, Y. S., CHOU, C. C. (2010). *Changes in the contents of sugars and organic acids during the ripening and storage of sufu, a traditional Oriental fermented product of soybean cubes*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 22;58(24):12790-3. doi: 10.1021/jf1033653
- NAGAI, T., TAMANG, J.P. (2010). *Fermented Legumes: Soybeans and non-Soybeans Products*. In: TAMANG, J.P., KAILASAPATHY, K. (Eds.), *Fermented Foods and Beverages of the World*. CRC Press, New York, 41–72.
- NEHIR, S., SIMSEK, S. (2012). *Food Technological Applications for Optimal Nutrition: An Overview of Opportunities for the Food Industry*, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* Volume 11, Issue 1, p. 2–12, January 2012
- NGUYEN, D. T. L., HOORDE, K. V., CNOCKAERT, M., BRANDT, E. D., AERTS, M., THANH, L.B., VANDAMME, P. (2013). *A description of the lactic acid bacteria microbiota associated with the production of traditional fermented vegetables in Vietnam*. *International Journal of Food Microbiology*, 163, 19-27.
- NORONHA, J. F., (2003). *Análise Sensorial – Metodologias*, Aparentamentos de Analise sensorial, Escola Superior Agrária de Coimbra.
- NOUT, M. J. R., ROMBOUTS, F. M. (1990). *A review: recent developments in tempe research*. *Applied bacteriology*, 69, 629-633.
- OKPALA, L.C., EKWE, O. O. (2013). *Nutritional quality of cookies produced from mixtures of fermented pigeon pea, germinated sorghum and cocoyam flours*. *European Journal of Food Research & Reviews*.
- OYAREKUA, M. A. (2010). *Sensory evaluation, nutritional quality and antinutritional factors of traditionally co-fermented cereals/cowpea mixtures as infant complementary food Agriculture. Biological. Journal. N. Am.*, 1(5), 950-956.
- PACHER, H. L., THOMAS, C. R. (1990). *Morphological measurements on filamentous microorganisms by fully automatic image analysis*. *Biotechnology and Bioengineering*, 35, 870-881.

- PATERSON, R. R. M., LIMA, N. (2010). *Toxicology of mycotoxins*, in: Luch, A. (Ed.), *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology, Clinical Toxicology*. Vol. 2, Birkhäuser Verlag, Switzerland, 31–63.
- PERDONCINI, M. G. (2012). *Morfologia dos fungos*. Microbiologia dos Fungos, 2-79.
- POMBO, C. R., (2007). Avaliação Físico-química e bacteriológica de Peixes Anchovados – Centro de Ciências Médicas, Universidade Federal do Fluminense, Niteroi/RJ.
- Pr NP 4263 (1994). *Análise Sensorial- Vocabulário*. IPQ, Lisboa.
- PRICE, R. J., LEE, J. S. (1970). *Inhibition of Pseudomonas species by hydrogen peroxide producing lactobacilli*. Journal of Milk and Food Technology 33, 13–18.
- PRINYAWIWATKUL, W., BEUCHAT, L.R., MCWATTERS, KH., AND PHILLIPS, R.D., (1996). *Fermented cowpea flour: production and characterization of selected physico-chemical properties*. J. Food Process. Preserv. 20: 265-284.
- R Core Team (2013). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0,
- RAY, B., DAESCHEL, M. (1992). *Food Biopreservatives of Microbial Origin*. CRC Press, Florida, USA.
- REDDY, N. R., SATHE, S. K., SALUNKHE, D. K. (1982). *Phytates in cereals and legumes*. Advances in Food Research, 28, 1–92.
- RODRIGUES, P., VENÂNCIO, A., LIMA, N., (2012). *Mycobiota and mycotoxins of almonds and chestnuts with special reference to aflatoxins*. Food Research International, 48, 76–90.
- ROSA, A. M., CLAVISO, J., PASSOS, L. M. L., AGUIAR, C. L. (2009). *Alimentos fermentados à base de soja (Glycine max (Merrill) L.): importância económica, impacto na saúde e efeitos associados às isoflavonas e seus açúcares*. Revista Brasileira de Biociências.
- ROSS, R. P., LYON MORGAN, S., HILL, C. (2002). *Preservation and fermentation: past, present and future*. International. Journal of Food Microbiology, 79, 3-16.
- RUIZ-TERÁN, F., Owens, J. D., (1996) Chemical and Enzymic Changes During the Fermentation of Bacteria-Free Soya Bean Tempe. Department of Food Science and Technology, The University of Reading, Reading, RG6 6AP, UK.
- SCOOT, R., SILLIVAN, W. C. (2008). *Ecology of fermented foods*. Human Ecology Review, 15, 25-31.
- SHURTLEFF, W., AOYAGI, A., (1986). *Tempeh Production, A Craft and Technical Manual*. Soy Food Center.

- SILVA, D. T. (2008). *Extrato de Soja: características, métodos de obtenção e compostos benéficos a saúde humana*. UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS Departamento de Ciências dos Alimentos.
- SILVA, R. R., COELHO, G. D. (2006). *Fungos – Principais grupos e aplicações Biotecnológicas*, São Paulo.
- SPARRINGA, R. A., OWENS, J. D. (1999). *Protein utilization during soybean Tempe Fermentation*. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 47, 4375-4378.
- STEINKRAUS, K. H. (1979). *Microbiology of fermented food in Tropical Asia*. In S. Saono & F. G. Wirnanno (Eds.), *Proceedings of International Symposium of Microbiological Aspects of food Storage, Processing and Fermentation in Tropical Asia*. Indonesia, Bogos, 12-22.
- STEINKRAUS, K. H. (1983). *Lactic acid fermentation in the production of foods from vegetables, cereals and legumes*, Institute of Food Science, Cornell University, Geneva Ithaca, N. Y. 14456, U.S.A..
- STEINKRAUS, K. H. (1994). *Nutricional significance of fermented food*. Food Research International, 27, 259–267.
- STEINKRAUS, K. H. (1996). *Handbook of Indigenous Fermented Foods*, Second edition. Marcel Dekker, New York.
- STEINKRAUS, K. H. (1997). *Classification of fermented foods: worldwide review of household fermentation techniques*, Food control, 8, 311-331.
- TAMIMI, K. M.; HUTCHINSON, S. A. (1975). *Differences between the biological effects of culture gases from several species of Trichoderma*. Transactions of the British Mycological Society, London, v. 64, p. 455-463.
- THANH, N. V., NOUT, M. J. R., (2004). Dormancy, activation and viability of *Rhizopus oligosporus* sporangioopores. International Journal of Food Microbiology 92, pp 171-179.
- TORTORA, G. J., FUNKE, B. R., CASE, C. L. (2008). *Microbiologia*. Porto Alegre: Artmed, 8.
- VARELLA, C. A. A. (2008). *Análise de Componentes Principais – Análise Multivariada Aplicada às Ciências*. Seropédia RJ
- VARZAKAS, T. (1998). *Rhizopus oligosporus mycelial penetration and enzyme diffusion in soya bean tempe*, Process Biochemistry, 33, 741-747.
- VASCONCELOS, S. (2012) *Análise de componentes principais*. 2-12.
- VINDEROLA G. (2008). *Dried cell-free fraction of fermented milks: new functional additives for the food industry*. Trends in Food Science and Technology, 19, 40-46.



- WIESEL, I., REHM, H. J., BISPING, B. (1997). *Improvement of tempe fermentations by application of mixed cultures consisting of Rhizopus sp. and bacterial strains*. Applied Microbiology and Biotechnology, 47, 218-225.
- WILHELM, J., PINGOUD, A. (2003). Real-time polymerase chain reaction. ChemBioChem, 4, 1120-1128.

## Cibergrafia

<http://kurtikucinarius.blogspot.pt/2011/03/tempeh-seguranca-em-forma-de-comida.html>  
 acedido a 4 Julho de 2013

<http://jocooking.typepad.com/jocooking/2007/05/tempeh.html> acedido a 4 Julho de 2013

<http://macroexotic.com/culinaria/artigos/alimentos-fermentados/> acedido a 16 Junho de 2013

<http://macroexotic.com/culinaria/artigos/alimentos-fermentados/> acedido a 9 de Julho de 2013

<http://pt.scribd.com/doc/51759264/Fisiologia-de-fungos-GRD-1>  
[http://tempehproteinavegetal.blogspot.pt/2010/11/tempeh-proteina vegetal 1908.html](http://tempehproteinavegetal.blogspot.pt/2010/11/tempeh-proteina_vegetal_1908.html)  
 acedido a 4 julho de 2013

[http://users.med.up.pt/cc0410/Microdesgravadas/22\\_Intro\\_Micologia.pdf](http://users.med.up.pt/cc0410/Microdesgravadas/22_Intro_Micologia.pdf) acedido a 4 de Julho de 2013

<http://www.ebah.com.br/content/ABAAABaWsAB/bolores-leveduras> acedido a 4 de Julho de 2013

<http://www.esmeraldazul.com/pt/blog/soja-companhia/#sthash.klRfOeE6.dpuf> acedido a 4 de julho de 2013

<http://www.esmeraldazul.com/pt/blog/alimentos-fermentados-uma-ajuda-preciosa-para-a-sua-saude-2-2/#sthash.0SoCITxk.dpuf> acedido 15 de Julho de 2013

[http://www.fao.org/docrep/X5036E/x5036E0P.HTM#Fungal damage in durable foodstuffs with special reference to storage in the tropics](http://www.fao.org/docrep/X5036E/x5036E0P.HTM#Fungal%20damage%20in%20durable%20foodstuffs%20with%20special%20reference%20to%20storage%20in%20the%20tropics), acedido a 29 de Junho de 2013

<http://www.icb.ufmg.br/mic/material/morfologiafisiologiaeclasseificadosfungos.pdf> acedido a 29 de Junho de 2013

[http://www.infopedia.pt/\\$fisiologia-dos-fungos](http://www.infopedia.pt/$fisiologia-dos-fungos) acedido a 29 de Junho de 2013

[http://www.infopedia.pt/\\$reino-dos-fungos](http://www.infopedia.pt/$reino-dos-fungos) acedido a 29 de Junho de 2013

<http://www.eufic.org/article/pt/artid/mundo-pequeno/> acedido a 29 de Junho de 2013

[http://www.anew.com.br/flor anew\\_alimentos.htm](http://www.anew.com.br/flor anew_alimentos.htm) a 29 de Junho de 2013

<http://www.soyinfocenter.com/HSS/europe4.php> a 29 de Junho de 2013

<http://universoalimentos2.blogspot.pt/2010/08/missosho-yu-e-os-alimentos-fermentados.html> acedido a 12 Junho 2013

[http://www.insumos.com.br/aditivos\\_e\\_ingredientes/materias/384.pdf](http://www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/materias/384.pdf) acedido a 12 Julho 2013

FAO. Statistical databases. Disponível em: < <http://www.fao.org/>>. a 29 de Junho de 2013

<http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/fungos/fungos-9.php> a 29 de Junho de 2013

[http://www.e-macrobio-tica.com/artigos\\_e\\_multimedia/artigos/alimentacao](http://www.e-macrobio-tica.com/artigos_e_multimedia/artigos/alimentacao) acedido a 12 junho 2013

<https://dspace.ist.utl.pt/bitstream/2295/49184/1/Clusters.pdf> acedido a 8 de Outubro de 2013

<http://www.R-project.org/>. Acedido a 8 de Outubro de 2013

## Anexos

### A1 - Meio de cultura

Meio PDA é um meio sólido usado para isolar, crescer e manter fungos.

A superfície solidificada do meio de cultura fornece as condições adequadas para o desenvolvimento do micélio e permite visualizar a presença de contaminantes.

Utiliza-se a batata como fonte de nutrientes.

Composição do PDA: batata, dextrose, agar e água destilada, este meio vinha pré-formulado e só se adicionou água de acordo com as indicações do fabricante, 39g/L.

A dextrose é um tipo de açúcar, fornece os hidratos de carbono necessários ao desenvolvimento do micélio

Meio MEA (Extrato de malte com ágar) é um meio sólido usado para o crescimento de fungos filamentosos.

Procedimentos (ativação e crescimento de rhizopus)

Meios de cultura

MEA – 30g/l malte extract, 5g/l peptona, 15g/l agar

PDA – usou-se 39g de PDA pré formulado para 1l de água esterilizada

## A2 - Contagem de esporos

Câmara de Neubauer também referida como hemocitômetro, é uma lâmina grossa de uso microscópico, com formato retangular e normalmente de vidro, com uma depressão no centro, utilizada para fazer contagem de células por unidade de volume de uma suspensão. Podem ser contadas as células sanguíneas, tais como as hemácias ou eritrócitos, os diferentes tipos de leucócitos (leucócitos granulócitos e agranulócitos) como também as plaquetas. Além disto, podem ser enumerados também alguns microrganismos.

No centro desta lâmina existem várias linhas perpendiculares com marcações em quadrantes. Ao analisar em microscópico com a objetiva de imersão, pode-se perceber que existem três tipos de quadrantes, que juntos formam um quadrado maior. Estes quadrantes são usados para fazer as contagens e assim determinar a concentração de células em um determinado volume de fluido, para poder calcular a concentração de células no líquido global (do qual foi tirado a amostra analisada).

<http://www.infoescola.com/materiais-de-laboratorio/camara-de-neubauer/>

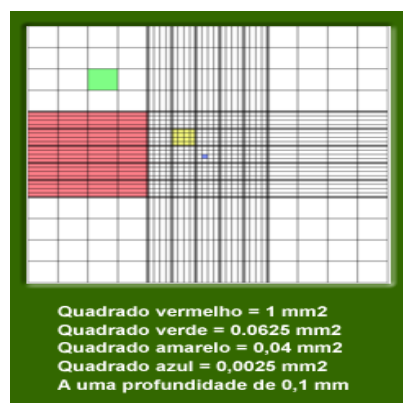


Figura 39 - Hemocitômetro

## A3 - Registos de pH

Tabela com os registos de pH da água de demolha

	0h		6h		12h		24h	
	Com Ácido	Sem ácido	Com Ácido	Sem ácido	Com Ácido	Sem ácido	Com Ácido	Sem ácido
<b>Soja</b>	2,84	6,21	4,96	6,11	5,23	6,06	5,57	5,06
<b>Lentilha</b>	3,82	6,36	4,94	6,16	5,12	6,10	5,43	6,05
<b>Mungo</b>	2,47	6,53	4,2	5,79	4,55	5,54	5,12	5,23
<b>Cevada</b>	3,47	5,91	4,04	5,53	4,12	5,42	4,13	5,45

**Tabela 6 - Evolução do pH na água de demolha**

Tempo de demolha	Matéria-prima					
	F. frade	F. preto	F. encarnado	F. branco	Grão	Tremoço
0h	6,22	6,33	6,71	6,94	6,21	4,82
12h	5,46	6,13	5,79	6,01	5,73	4,72
24h	5,67	5,80	5,85	5,80	4,44	4,51

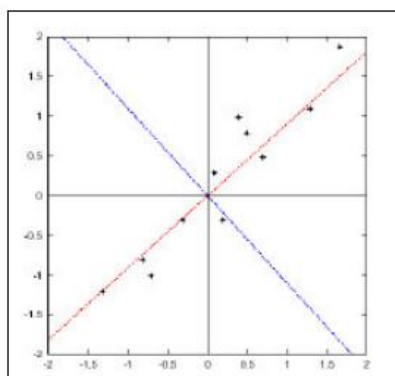
**Tabela 7 - Registo da observação do pH**

## A4 - Análise estatística

### Metodologias

#### Análise de componentes principal

A análise de componentes principais (PCA) é uma maneira de identificar a relação entre características extraídas de dados. É bastante útil quando os vetores de características têm muitas dimensões, quando uma representação gráfica não é possível, mas também pode ser útil em dimensões menores, como mostra a Figura 33.



**Figura 40 - Linha vermelha mostra a distribuição principal dos dados e a linha azul a distribuição secundária**

A componente principal é o arranjo que melhor representa a distribuição dos dados (linha vermelha na Figura 40) e a componente secundária é perpendicular a componente principal (linha azul na Figura 40) (Vasconcelos, 2012).

Os passos para calcular as componentes principais são:

Obter os dados ou as  $M$  amostras de vetores de dimensão  $n$ ;

- Calcular a Média ou o vetor médio destes dados;
- Subtrair a média de todos os itens de dados;
- Calcular a matriz de covariância usando todas as subtrações. Ela é o resultado da média do produto de cada subtração por ela mesma e terá dimensão  $Q \times Q$ ;
- Calcular os auto valores e os auto vetores da matriz de covariância.
- Arranjar a matriz da transformada de Hotelling (cujas linhas são formadas a partir dos auto vetores da matriz de covariância arranjados de modo que a primeira linha, o elemento  $(0,0)$ , seja o auto vetor correspondente ao maior auto valor, e assim sucessivamente até que a última linha corresponda ao menor auto valor.

O auto vetor com o maior valor associado, corresponde à componente principal do conjunto de dados usados. Isso significa que esse é o relacionamento mais significativo entre as dimensões dos dados (Vasconcelos, 2012; Gabriel, 1971).

### Análise de Clusters

O método da análise de Clusters pode ser descrito da seguinte forma: dado um conjunto de  $n$  indivíduos para os quais existe informação sobre a forma de  $p$  variáveis, o método agrupa os indivíduos em função da informação existente, de modo que os indivíduos de um grupo sejam tão semelhantes quanto possível e sempre mais semelhantes, aos elementos do mesmo grupo do que a elementos dos restantes grupos.

A seleção das variáveis de partida, que caracteriza cada indivíduo, deve ser cuidada. Nesta análise não deverá existir dependência entre as variáveis, ou seja, os grupos configuram-se sem ser necessário definir uma relação causal entre as variáveis utilizadas (<https://dspace.ist.utl.pt/bitstream/2295/49184/1/Clusters.pdf>).

A análise de Clusters deverá seguir cinco etapas genéricas:

1. Seleção de indivíduos ou de uma amostra de indivíduos a serem agrupados, no caso de estudo.
2. Definição do conjunto de variáveis a partir das quais será obtida a informação necessária ao agrupamento de indivíduos.
3. Definição da distância entre cada Nut III.
4. Definição do algoritmo de classificação
5. Validação dos resultados encontrados

<https://dspace.ist.utl.pt/bitstream/2295/49184/1/Clusters.pdf>